

**Bedeutung von muskarinergen
Acetylcholin-Rezeptoren in der
Pathophysiologie der DYT1 Dystonie:
Untersuchungen zur Expression im DYT1
knock-in Mausmodell**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

eingereicht von: Dipl. Pharm. Laura Klein

Geburtsdatum/-ort: 16.02.1991 Berlin

angefertigt an der Universität Leipzig in der Medizinischen Fakultät und
Veterinärmedizinischen Fakultät

Betreuer: Prof. Dr. Achim Aigner

Ko-Betreuer: Prof. Dr. Angelika Richter

Beschluss über die Verleihung des Doktorandengrades vom: 12.02.2019

Widmung

Meiner ganzen Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einführung	1
1.1 Dystonie	1
1.1.1 Einteilung und Therapie der Dystonie	1
1.1.2 Die primäre DYT1-Torsionsdystonie	4
1.1.2.1 Das DYT1 knock-in Mausmodell	5
1.1.3 Pathophysiologie der Dystonie	7
1.2 Physiologie und pathophysiologische Bedeutung von Acetylcholin	9
1.2.1 Acetylcholin und seine Rezeptoren	9
1.2.2 Acetylcholin als Neurotransmitter in den Basalganglien	12
2 Aufgabenstellung	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Tiere	19
3.1.1 DYT1 knock-in Mausmodell	19
3.1.2 Fütterung und Haltung	20
3.2 Material	20
3.3 Methoden	22
3.3.1 Genotypisierung von DYT1 KI Mäusen	22
3.3.2 Etablierung einer immunhistochemischen Färbung von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) an Mausgehirnen	23
3.3.2.1 Immunhistochemische Überprüfung der M1 Expression im Mausgehirn	24
3.3.2.2 Immunhistochemische Färbung der M4-Rezeptoren im Mausgehirn	25
3.3.2.2.1 Immunhistochemische Überprüfung der M4 Expression auf cholinergen Interneuronen (ChI) mittels ChAT	26
3.3.2.2.2 Immunhistochemische Überprüfung der M4-Expression auf Projektionsneuronen (MSN) mit Substanz P	27
3.3.3 Untersuchungen der mRNA Expression von mAChR mittels quantitativer real-time PCR (RT-qPCR)	28
3.3.3.1 Probenpräparation	28
3.3.3.2 mRNA Isolation	29
3.3.3.3 cDNA Synthese	30
3.3.3.4 qPCR	31
3.4 Statistische Versuchsauswertung	32
3.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen	33
3.4.2 qPCR	34

4 Ergebnisse.....	35
4.1 Immunhistochemische Untersuchungen (IHC) am M1- und M4-Rezeptor	35
4.1.1 IHC von M1-Rezeptoren im Mausgehirn	35
4.1.2 IHC von M4-Rezeptoren im Mausgehirn	38
4.1.2.1 Färbung der M4-Rezeptoren im Gehirn ohne Ko-Markierung.....	38
4.1.2.2 Expression des M4-Rezeptors in cholinergen Interneuronen	41
4.1.2.3 Expression des M4-Rezeptors auf direkten Projektionsneuronen	49
4.2 Ergebnisse zur Untersuchung der mRNA mittels quantitativer PCR (qPCR).....	53
4.2.1 M1 mRNA Gehalte im Mausgehirn	53
4.2.2 M2 mRNA Gehalte im Mausgehirn	54
4.2.3 M3 mRNA Gehalte im Mausgehirn	56
4.2.4 M4 mRNA Gehalte im Mausgehirn	57
5 Diskussion	59
5.1 Ausgewählte Aspekte zur Methodik.....	59
5.1.1 Methodische Aspekte zur Genotypisierung.....	59
5.1.2 Methodische Aspekte zur IHC.....	59
5.1.3 Methodische Aspekte zur qPCR.....	61
5.2 Diskussion der Ergebnisse	62
5.2.1 Veränderungen von Gq-gekoppelten Rezeptoren (M1, M3) in DYT1 KI Mäusen.....	62
5.2.2 Veränderungen von Gi/o-gekoppelten Rezeptoren (M2, M4) in DYT1 KI Mäusen.....	64
5.3 Schlussbetrachtungen	68
6 Zusammenfassung	70
7 Summary	72
8 Literaturverzeichnis	74
9 Anlagen	87
9.1 Liste Chemikalien.....	87
9.2 Liste Geräte/ Materialien	87
9.3 Puffer und Lösungen.....	89
9.4 Verwendete Software.....	90
9.5 Relative mRNA-Expression	91
9.5.1 Relative M1 mRNA-Expression.....	91
9.5.2 Relative M2 mRNA-Expression.....	92
9.5.3 Relative M3 mRNA-Expression.....	93
9.5.4 Relative M4 mRNA-Expression.....	94
9.6 Intensitätsmessung der Immunhistologie	95
9.6.1 Bildausschnitte der Übersichtsfärbung.....	95
9.6.2 ChAT-positive Zellen	96
9.6.3 Sub P-positive Zellen.....	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Dystonie nach Ätiologie und klinischen Charakteristika.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung wichtiger Verbindungen innerhalb der Basalganglien (A) und Hypothese zur Entstehung von Dystonien (B).....	9
Abbildung 3: Muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren und ihre Subtypen M1 bis M5.	11
Abbildung 4: Schematische Übersicht der Verteilung cholinerg Neurone und ihrer Projektionen im Gehirn.	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Afferenzen und Efferenzen zwischen cholinergen Interneuronen (ChI) und Projektionsneuronen (MSN) des Striatums (A) sowie Interaktionen zwischen ChI und anderen Neurotransmittern im Striatum (B).....	14
Abbildung 6: Transversalschnitt eines Mausgehirns.	25
Abbildung 7: Programm Ablauf vom Thermocycler für die cDNA-Synthese.	31
Abbildung 8: Immunhistochemische Markierung von M1-Rezeptoren bei Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe).	36
Abbildung 9: Fluoreszenzintensitäten des M1-Rezeptors in Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken).....	37
Abbildung 10: Immunhistochemische Markierung von M4-Rezeptoren bei Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe).	39
Abbildung 11: Fluoreszenzintensitäten des M4-Rezeptors in Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken).....	40
Abbildung 12: Immunhistochemische Markierung von ChI, M4-Rezeptoren und deren Kombination im Striatum von Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe).	42
Abbildung 13: Vergrößerte Darstellung eines ChI mit Zellkörper und Zellausläufern.	43
Abbildung 14: Größe striataler ChI von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken).....	44
Abbildung 15: Fluoreszenzintensität des M4-Rezeptors in striatalen ChI von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken).	45
Abbildung 16: Fluoreszenzintensität von ChAT in striatalen ChI von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken).	46
Abbildung 17: Histogramme zur Fluoreszenzintensität und Größe der Neurone bei Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken).	47
Abbildung 18: Dot Density für Kontrolltiere (graue Punkte) und DYT1 KI Tiere (rote Punkte).	47
Abbildung 19: Punktdiagramm von Kontrolltiere (graue Punkte) und DYT1 KI Tiere (rote Punkte).	48
Abbildung 20: Immunhistochemische Markierung von Substanz P, M4-Rezeptoren und deren Kombination im Striatum von Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe).	50
Abbildung 21: Vergrößerte Darstellung von einem Substanz P positiven und negativen Neuron.	51
Abbildung 22: Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren in Substanz P positiven Neuronen von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken).	52
Abbildung 23: Fluoreszenzintensität von Substanz P in Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken).....	53
Abbildung 24: Relative mRNA-Expression von M1-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken).....	54

Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von M2-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken).....	55
Abbildung 26: Relative mRNA-Expression von M3-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken).....	57
Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von M4-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken).....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtanzahl.	19
Tabelle 2: Pipettierschema cDNA-Synthese für alle 4 Gehirnregionen.	30
Tabelle 3: 5 µl Ansatz für das Reagenzienverhältnis pro Well.....	31
Tabelle 4: Programm qPCR	32

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
A2AR	Adenosin A2A Rezeptor
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
C. callosum	Corpus callosum
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholinacetyltransferase
ChI	Cholinerge Interneurone
CX	Cortex
D1R	Dopamin D1-Rezeptor
D2R	Dopamin D2 Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DYT1	Primäre DYT1-Torsionsdystonie
EPN	Nucleus endopeduncularis
GABA	γ -Aminobuttersäure
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
G-Protein	Guanin-bindendes Protein
h	Stunde
HVA	Homovanillinsäure
IHC	Immunhistochemische Untersuchung/Immunhistochemie
IN	Interneurone
KI	Knock-in
M1 bis M5	Subtypen 1 bis 5 vom muscarinergen Acetylcholinrezeptor
mAChR	Muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren
mGlu5-Rezeptor	Metabotroper Glutamatrezeptor Subtyp 5
min	Minuten
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSN	Medium Spiny Neurons
MW	Mittelwert
nAChR	Nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren
NaOH	Natriumhydroxid
NDS	Normal Donkey Serum
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SN	Substantia nigra
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
STR	Striatum
Sub P	Substanz P
Tab.	Tabelle
TH-	Thalamus
TX	Triton X-100
UE	Untereinheit
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einführung

1.1 Dystonie

Dystonien zählen neben Morbus Parkinson und essentiellm Tremor zu den häufigsten Bewegungsstörungen beim Menschen. Diese neurologische Erkrankung mit variablem Erscheinungsbild ist charakterisiert durch anhaltende oder intermittierende unwillkürliche Muskelkontraktionen, die zu abnormen, verdrehten Bewegungen und Körperhaltungen führen (Breakefield et al., 2008). Durch willkürliche Muskelbewegungen können Dystonien initiiert bzw. verschlechtert werden (Albanese et al., 2013).

Der Begriff „Dystonie“ setzt sich aus dem Griechischen *dys* = miss-, krankhaft und dem Lateinischen *tonus* = Spannung zusammen und wurde erstmals 1911 vom Neurologen Oppenheim eingeführt (Oppenheim, 1911). Die erste systematische Einteilung der Dystonien erfolgte 1984 durch das Comité der Dystonia Medical Research Foundation und wurde nachfolgend mehrfach modifiziert (LeDoux, 2012; Albanese et al., 2013).

Die Gesamtprävalenz aller Dystonieformen (s. 1.1.1.) wird mit einer Häufigkeit zwischen 40/100.000 bis 1800/100.000 angegeben (Nutt et al., 1988; Augood et al., 2002; Wenning et al., 2005). Schätzungsweise liegt die eigentliche Prävalenz höher, da nicht alle Fälle von Dystonie als solche diagnostiziert werden. Dies trifft vermutlich auch für die bei Haustieren beschriebenen dystonen Störungen zu (Richter et al., 2015).

1.1.1 Einteilung und Therapie der Dystonie

Frequenz, Dauer und Ausprägungsstärke ergeben bei Dystonien ein heterogenes Erscheinungsbild. Dystonien werden in zwei Achsen unterteilt: nach klinischen Charakteristika und der Ätiologie (Abb. 1). Die klinischen Charakteristika werden aufgeteilt in: Alter bei Beginn der Erkrankung, betroffene Körperregionen, zeitlicher Verlauf der Erkrankung und andere Begleitsymptome wie Myoklonien (Stamelou et al., 2012; Albanese et al., 2013). Die Ätiologie gliedert sich in pathologische Befunde und vererbare, erworbene oder idiopathische Dystonien.

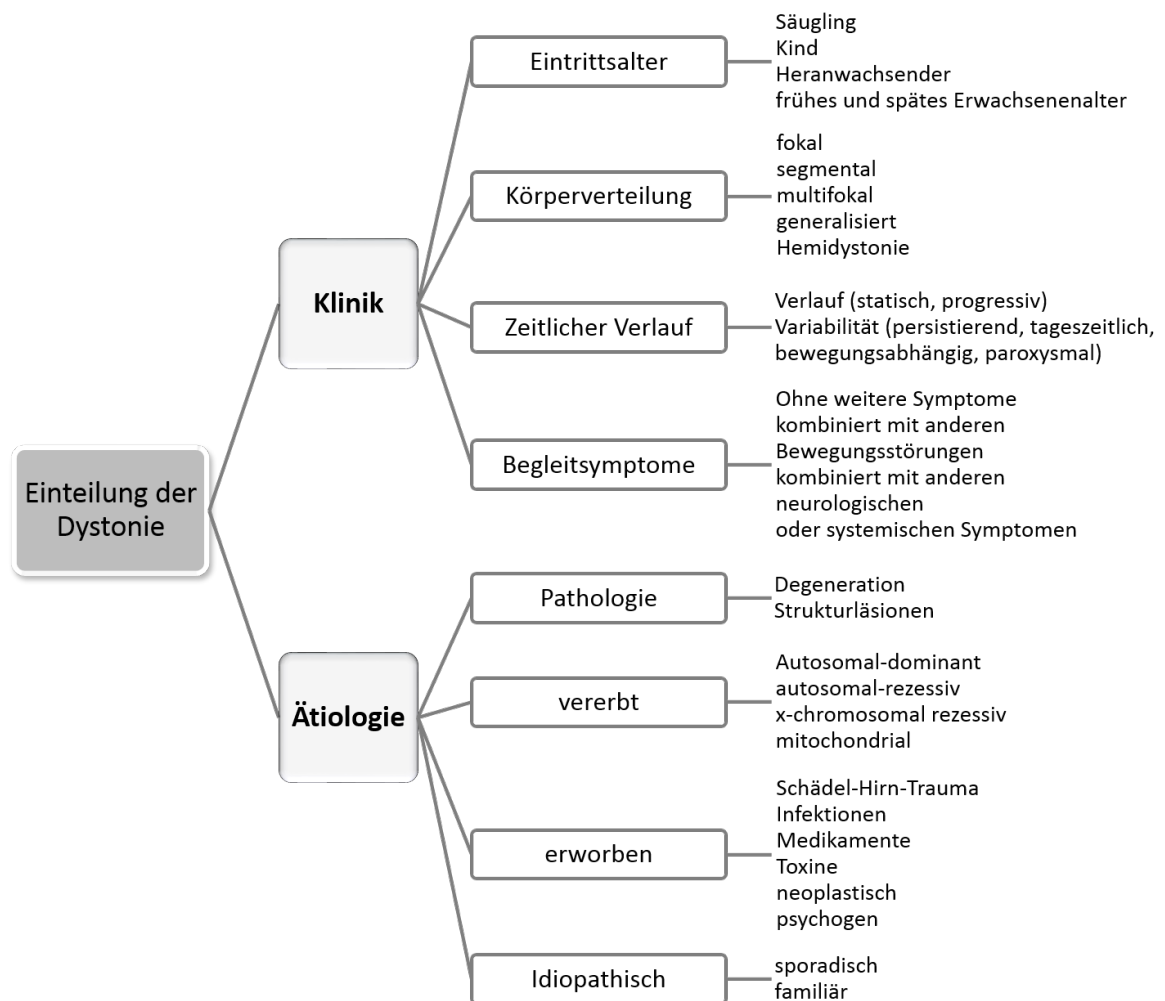


Abbildung 1: Einteilung der Dystonie nach Ätiologie und klinischen Charakteristika. Modifiziert nach (Albanese et al., 2013).

In „erworbenen Dystonien“ (auch sogenannte „sekundäre Dystonien“) kommt es zu makro- und mikroskopischen Veränderungen, während solche Erscheinungen bei nicht-erworbenen Dystonien (auch als „primäre Dystonie“ bezeichnet) nicht auftreten (Breakefield et al., 2008). Bei den „erworbenen Dystonien“ können häufig pathologische Veränderungen im Putamen und Nucleus caudatus (Striatum; STR) nachgewiesen werden, aber auch andere Regionen (Globus pallidus internus, Thalamus, Hirnstamm, Cerebellum und frontalen und parietalen CX) können beteiligt sein (Tanabe et al., 2009).

Bisher wurden 25 verschiedene genetische Formen von Dystonien entdeckt (DYT1 bis DYT25), die alle durch unterschiedliche Genmutationen bzw. Gendefekte gekennzeichnet sind (Lohmann and Klein, 2013) und die nach ihren Genen benannt wurden. Die meist autosomal-dominant vererbbaeren Formen zeichnen sich durch eine geringe Penetranz aus (Albanese et al., 2013). Dies spricht dafür, dass auch andere

Faktoren wie Virusinfektionen, Stress oder Genpolymorphismus zur Auslösung der Symptomatik führen können (Breakefield et al., 2008). Trotz Aufdeckung verschiedener Gendefekte ist die Pathophysiologie der Dystonie bisher weitgehend unklar.

Mangelnde pathophysiologische Erkenntnisse erschweren eine Therapie der Dystonie. Die Ansprechbarkeit der Dystonie auf verschiedene empirisch ausgewählte Therapeutika ist außerdem je nach Form der Dystonie variabel (Jankovic, 2009).

Anticholinergika wie Trihexyphenidyl werden vor allem bei generalisierten Formen der Dystonie eingesetzt. Eine Verbesserung der Symptomatik wird in der Regel erst nach mehrwöchiger Behandlung gesehen. Derzeitig eingesetzte Anticholinergika, die nicht selektiv an bestimmten Rezeptorsubtypen wirken, müssen hoch dosiert werden und verursachen häufig zentrale und periphere Nebenwirkungen (Katzenschlager et al., 2002; Jankovic, 2006). Bisher mangelt es an pathophysiologischen Kenntnissen zur Expression von mAChR Subtypen bei Dystonien, um mögliche Therapieoptionen für Subtyp-selektive Antagonisten ableiten zu können.

Der Dopaminvorläufer Levodopa (L-DOPA) ist bei einer Sonderform der Dystonie, der DOPA-responsiven Dystonie, in niedrigen Dosierungen hoch effektiv (Nygaard, 1995). Bei anderen Dystonieformen können hingegen antidopaminerge Substanzen zu einer moderaten Verbesserung der Symptomatik führen (Jankovic, 2004). Auch GABA-potenzierende Arzneimittel wie Baclofen und Benzodiazepine sind nicht selten bei segmentalen und generalisierten Dystonien wirksam (Jankovic, 2013).

Zur Therapie von fokalen Dystonien wird Botulinumtoxin (Botox) in die überaktiven Muskeln injiziert (Jankovic and Orman, 1987; Albanese, 2011; Thenganatt and Fahn, 2012). Botulinumtoxin führt über Monate zu einer verminderten Acetylcholinausschüttung an der motorischen Endplatte mit temporärer lokaler Chemodenervation und Paralyse (Jankovic, 2013).

Da Patienten mit generalisierten Dystonien oder Dystonien, die mehrere Muskelgruppen betreffen, häufig nicht ausreichend auf die oben genannten Arzneimittel ansprechen, kommen auch chirurgische Verfahren, insbesondere die tiefe Hirnstimulationen in einer Ausgangsstruktur der Basalganglien, dem Globus pallidus internus, zum Einsatz (Vidailhet et al., 2005; Albanese et al., 2013).

Insgesamt mangelt es an wirksamen medikamentösen Therapieoptionen zur Behandlung verschiedener Dystonieformen (Ozelius et al., 2011). Die Erforschung der Pathophysiologie und das Auffinden neuer Zielstrukturen ist Voraussetzung zur

Entwicklung neuer, effektiver Arzneimittel (Breakefield et al., 2008; Richter and Richter, 2014).

1.1.2 Die primäre DYT1-Torsionsdystonie

Die primäre DYT1-Torsionsdystonie (DYT1) ist die häufigste erbliche Form der Dystonie (Ozelius et al., 1997). Ihre Prävalenz in der Gesamtbevölkerung liegt bei 1/60.000. Die DYT1 wird autosomal-dominant vererbt mit einer Penetranz von lediglich ca. 30% (Bressman et al., 1989; Risch et al., 1990; Bressmann, 2006), d.h. bei den meisten Genträgern treten keine Dystoniesymptome auf. Die Faktoren zur Auslösung der Penetranz sind noch nicht geklärt (Fiorio et al., 2007). Häufig manifestiert sich die DYT1 im Kindesalter bzw. in der frühen Pubertät und beschränkt sich zunächst auf eine Extremität (Bressman et al., 1994; Fahn et al., 1998). Im weiteren Verlauf der Krankheit kann es zu einer progressiven Generalisierung der Erkrankung kommen (Bressman et al., 1994; Greene et al., 1995).

Der Gendefekt bei der DYT1 Dystonie besteht in einer Trinukleotid-Deletion (ΔE) von GAG (Guanin Adenosin Guanin), wobei eine einfache Glutaminsäure am C-Terminus des Proteins TorsinA (ΔE -TorsinA) verloren geht (Klein et al., 1999; Ozelius et al., 1999). TorsinA gehört zu den AAA+ Proteinen (ATPase Associated with variety of cellular Activities) (Neuwald et al., 1999), die als Oligomere vorliegen. Die AAA+ ATPasen sind in verschiedene Funktionen involviert wie Proteinqualitätskontrollen (Entfaltung, Disaggregation, Abbau), Membranfusion, Vesikeltransport, DNA-Replikation und -reparatur (Vale, 2000; Ogura and Wilkinson, 2001). TorsinA besteht aus 332 Aminosäuren, weist ein Molekulargewicht von 32 kDA auf (Ozelius et al., 1997) und wird im Organismus postnatal ubiquitär exprimiert. Im Gehirn wird es vor allem im Cerebellum, Hippocampus, frontalem CX, in Thalamuskernen und dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta (SNc) exprimiert (Augood et al., 1999b). In den Basalganglien kommen geringere Mengen vor, wobei die Expression in cholinergen Interneuronen (ChI) am stärksten ist (Augood et al., 1999a). Torsin A ist sowohl im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) als auch in der Spalte zwischen innerer und äußerer Membran des Zellkerns lokalisiert (Hewett et al., 2000; Kustedjo et al., 2000; Liu et al., 2003; Naismith et al., 2004; Goodchild and Dauer, 2005). Obgleich zur Funktion von TorsinA nur begrenzte Kenntnisse vorliegen, wird davon ausgegangen, dass es Aufgaben für zelluläre Aktivitäten wie Wächter-Funktionen (Unterstützung bei nichtkovalenten Verbindungen zwischen Proteinen),

Proteintransport, Sekretion und Membranfusionen übernimmt (Goodchild and Dauer, 2005; Hewett et al., 2007; Breakefield et al., 2008; Granata et al., 2008).

Bei der DYT1 Dystonie gibt es keinen Unterschied in der Verteilung von ΔE -TorsinA zum normalen TorsinA im Gehirn (Rostasy et al., 2003). In verschiedenen Studien an Zellkulturen sowie in Tiermodellen oder Patienten als DYT1 Genträger konnten Akkumulationen von TorsinA in der Nähe des Zellkerns nachgewiesen werden (Hewett et al., 2000; Gonzalez-Alegre and Paulson, 2004; Goodchild and Dauer, 2004; McNaught et al., 2004; Giles et al., 2008). Somit führt eine Mutation des TorsinA zu einer abnormen Lokalisation in der Kernmembran. ΔE -TorsinA verursacht vermehrte Proteinkomplexbildungen, welche sich in einer Zusammenlagerung von normalem TorsinA mit mutiertem TorsinA widerspiegeln. Dadurch verliert TorsinA seine Funktionsfähigkeit und Schutzfunktion gegen oxidativen Stress (Kuner et al., 2003).

1.1.2.1 Das DYT1 knock-in Mausmodell

Die unzureichende Kenntnis über die Pathophysiologie der primären Dystonie, wie der DYT1 Dystonie, erschwert die Therapie. Zur Aufklärung der Pathophysiologie sind etablierte und validierte Tiermodelle nötig. Um eine Validierung eines Tiermodells vorzunehmen, werden die construct validity (gleiche Pathophysiologie wie beim Menschen), face validity (ähnliche Symptomatik wie beim Menschen) und die predictive validity (Ansprechen auf gleiche Therapiemaßnahmen wie beim Menschen) herangezogen (van der Staay, 2006). Die Heterogenität der Dystonie erschwert den Vergleich der Erkrankungscharakteristika zwischen menschlicher und tierischer Erkrankung. Man unterscheidet ätiologische Tiermodelle von phänotypischen (Jinnah et al., 2008). Phänotypische Modelle eignen sich für pharmakologische und pathophysiologische Untersuchungen. Ätiologische Tiermodelle ermöglichen Untersuchungen zu den Folgen von Gendefekten (Richter and Richter, 2014).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell ist ein ätiologisches Mausmodell- das sogenannte DYT1 ΔGAG knock-in Mausmodell (DYT1 KI). Ihm liegt eine Mutation der 3-Basenpaardeletion (ΔGAG) im Maus-TorsinA Gen zu Grunde (Dang et al., 2005). Es unterscheidet sich von den transgenen Mausmodellen, welche eine Überexpression des mutierten humanen TorsinA aufweisen (Sharma et al., 2005). Das DYT1 KI Mausmodell zeichnet sich durch eine hohe „construct validity“ aus (Richter and Richter, 2014). Das körpereigene Gen reguliert durch den eigenen Promotor die Expression des TorsinA Gens. Somit findet eine realistische Widerspiegelung der Genveränderung statt. Wird das Gen homozygot vererbt, sterben

die Mäuse postnatal. Heterozygote Tiere überleben, zeigen aber keine dystonen Symptome (Dang et al., 2005; Tanabe et al., 2012). Durch genauere Verhaltensanalysen konnten bei DYT1 KI mit einem reinen C57BL6/J Hintergrund sensomotorische Defizite nachgewiesen werden (Richter et al., 2017).

Akute pharmakologische Manipulationen führten bei den heterozygoten DYT1 KI Mäusen nicht zu dystonen Symptomen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen riefen der mAChR-Antagonist Scopolamin, der Dopamin D2 (D2R)-Agonist Quinpirol, der D2R-Antagonist Haloperidol sowie Amphetamin bei den DYT1 KI Mäusen kein abweichendes Verhalten hervor (Tanabe et al., 2012). Bei DYT1 Mäusen mit einem anderem Hintergrund wurde nach Gabe des M1-Rezeptorantagonisten Trihexyphenidyl eine Verminderung der Fehler auf dem Balkentest beobachtet (Dang et al., 2012) und im Elektromyogramm zeigte sich ein Verschwinden von Ko-Kontraktionen antagonistischer Muskelgruppen (DeAndrade et al., 2016).

Bei Untersuchungen am D1R und D2R sind keine Änderungen der mRNA-Gehalte gefunden worden, während eine verminderte Proteinexpression und Bindungsfähigkeit nachweisbar war (Dang et al., 2012; Yokoi et al., 2015; Zhang et al., 2015). Weitere Analysen auf Proteinebene von polytrophen membranassoziierten Proteinen wie den glutamatergen Rezeptoren GluR1, GluR2, GluR2/3 und GluR4 und den M4R und A2AR zeigten keine Unterschiede (Yokoi et al., 2015). Im Gehirnhomogenat waren keine Konzentrationsunterschiede von Dopamin und deren Metabolite DOPAC und 3-MT in DYT1 KI Mäusen und ihren Wildtypen festzustellen. Lediglich der Metabolit HVA war in seiner Konzentration reduziert (Dang et al., 2005; Song et al., 2012). Eine Mikrodialysestudie von Song et al. (2012) zeigt ein vermindertes basales Dopaminlevel im STR und eine reduzierte Ausschüttung von Dopamin durch Amphetamin.

Die Größe und Struktur der verschiedenen Gehirnbereiche unterscheiden sich nicht zwischen Wildtypen und DYT1 KI Mäusen (Dang et al., 2005). Bei homozygoten Genträgern kommen Vesikel innerhalb der Zellkernmembran in vielen Bereichen des ZNS wie Cortex oder Hippocampus vor (Goodchild et al., 2005). Durch die Expression des mutierten TorsinA Gens kommt es zu einem Verlust des Expressionslevels auf Proteinebene, während keine Veränderungen auf mRNA Ebene nachweisbar sind (Goodchild et al., 2005). In heterozygoten DYT1 KI Mäusen fanden sich Proteinaggregate aus TorsinA und Ubiquitin im Zellkern des Nucleus ponti (Dang et al., 2005). Goodchild et al. (2005) konnten diese Aussage nicht bestätigen. Grobe strukturelle Unterschiede im STR waren nicht zu finden (Dang et al., 2012; Song et al.,

2013), cholinerge Interneurone waren jedoch 17% größer und wiesen eine 22% höhere Dichte im dorsolateralen STR auf. Auch parvalbuminerge Interneurone sind vergrößert und kommen vermehrt vor. Die Projektionsneurone der DYT1 KI Mäuse weisen dünnere, geringer verzweigte Dendriten auf und es liegt ein verändertes Verhältnis in den synaptischen Verbindungen vor (Song et al., 2013). In mutierten Mäusen ist das Cerebellum um 5% vergrößert, wobei dessen Purkinjezellen unverändert bleiben (Zhang et al., 2011; Song et al., 2014). Weiterhin kommt es zu einer Reduktion der axonalen Integrität und Kohärenz im sensomotorischen Cortex (CX), Putamen und Cerebellum, die mit einer reduzierten Verbindung zum Thalamus einhergeht. Die metabolische Aktivität hingegen ist im sensomotorischen CX und Cerebellum erhöht (Uluğ et al., 2011).

Bei DYT1 KI Mäusen und auch anderen DYT1 Mausmodellen konnten mittels elektrophysiologischer Studien an Hirnschnitten Veränderungen in der striatalen Plastizität nachgewiesen werden (Martella et al., 2014; Eskow Jaunarajs et al., 2015). Interessanterweise wurde in verschiedenen DYT1 Mausmodellen durch elektrophysiologische Untersuchungen eine Fehlregulation der cholinergen Interneurone festgestellt (Eskow Jaunarajs et al., 2015).

1.1.3 Pathophysiologie der Dystonie

Die Pathophysiologie von Dystonien ist bisher weitgehend unklar. Neuropathologische Veränderungen sind bei primären Dystonien, wie der DYT1 Dystonie, nicht nachweisbar. Bildgebende Verfahren zeigten eine abnorme metabolischen Aktivität in den Basalganglien sowie im Thalamus, Mittelhirn, Cerebellum und in den supplementären motorischen Gebieten (Eidelberg et al., 1998; Carbon et al., 2009). Viele Befunde bei Dystonieklienten weisen auf funktionelle Veränderungen innerhalb der Basalganglien hin (Breakefield et al., 2008; Nambu et al., 2011). In Tiermodellen für verschiedene Dystonieförmungen, wie dem *dt^{sz}* Hamster oder ätiologischen Modellen für DYT1 Dystonien, konnten Veränderungen in den Basalganglien nachgewiesen werden (Richter and Richter, 2014).

Die Basalganglien setzen sich aus subkortikal gelegenen, miteinander verschalteten Kernen zusammen. Zu den Funktionen der Basalganglien gehören neben der motorischen Steuerung auch assoziative, limbische, motivierende, emotionale und kognitive Prozesse (Bolam et al., 2000; Nakano, 2000; DeLong and Wichmann, 2007). Den Basalganglien gehören der Nucleus (N.) caudatus, N. lentiformis (bestehend aus

Putamen und Globus pallidus (GP)) und N. accumbens an. Auch die Substantia nigra (SN) und der N. subthalamicus (STN) werden dazugezählt (Smeets et al., 2000). Die SN gliedert sich noch einmal in die SN pars reticulata (SNr) und die SN pars compacta (SNc) (Bolam et al., 2000). Der GP teilt sich zusätzlich in zwei Kompartimente: dem internen GP (GPi) und dem externen GP (GPe). Beim Nager entspricht der GP dem GPe des Menschen und der N. endopeduncularis (EPN) dem GPi (Smeets et al., 2000). Bei Primaten sind das Putamen und der N. caudatus durch die interne Kapsel voneinander getrennt. Im Nager liegen beide Bereiche zusammen, werden streifenförmig von der Capsula interna durchzogen und als Striatum (STR) bezeichnet (Trepel, 2015). Das STR bildet die Eingangsstruktur der Basalganglien und ist an der Planung und Ausführung motorischer Aktivitäten beteiligt (Graybiel et al., 1994; Kreitzer and Malenka, 2008; Jin and Costa, 2010).

In Abb. 2A sind die Zusammenhänge der Verschaltungen zwischen den einzelnen Regionen schematisch dargestellt. Das STR erhält seine Afferenzen über exzitatorische glutamaterge Neurone vom Cortex (CX) und Thalamus (TH) sowie über dopaminerge Projektionen der SNc. Die Ausgangsstrukturen der Basalganglien sind der GPi und die SNr, welche über den TH zum CX projizieren (DeLong and Wichmann, 2007). Die striatalen Neurone werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: den Projektionsneuronen (medium spiny neurons, MSNs) und den Interneuronen (aspiny interneurons) (Kreitzer, 2009). 95% aller Neurone in den Basalganglien sind Projektionsneurone. Die restlichen 5% sind Interneurone (Rymar et al., 2004). Durch den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) beeinflussen die Projektionsneurone die Ausgangsstrukturen entweder über den striatonigralen direkten oder den striatopallidal indirekten Weg. Auf dem direkten Weg hemmen die Neurone den GPi, was in einer verminderten Hemmung des TH und somit zur vermehrten Aktivierung des CX resultiert. Der indirekte Weg hemmt den GPe. Dadurch wird der STN verstärkt aktiviert, welcher wiederum die Ausgangsstrukturen erregt. Dies führt zu einer erhöhten Aktivierung des TH und CX. Durch die Projektion des CX über die Pyramidenbahnen zu den spinalen Motoneuronen werden Muskelaktivitäten gesteuert (Trepel, 2015). Unter physiologischen Bedingungen (Abb. 2A) befinden sich der direkte und indirekte Weg im Gleichgewicht (Vitek, 2002).

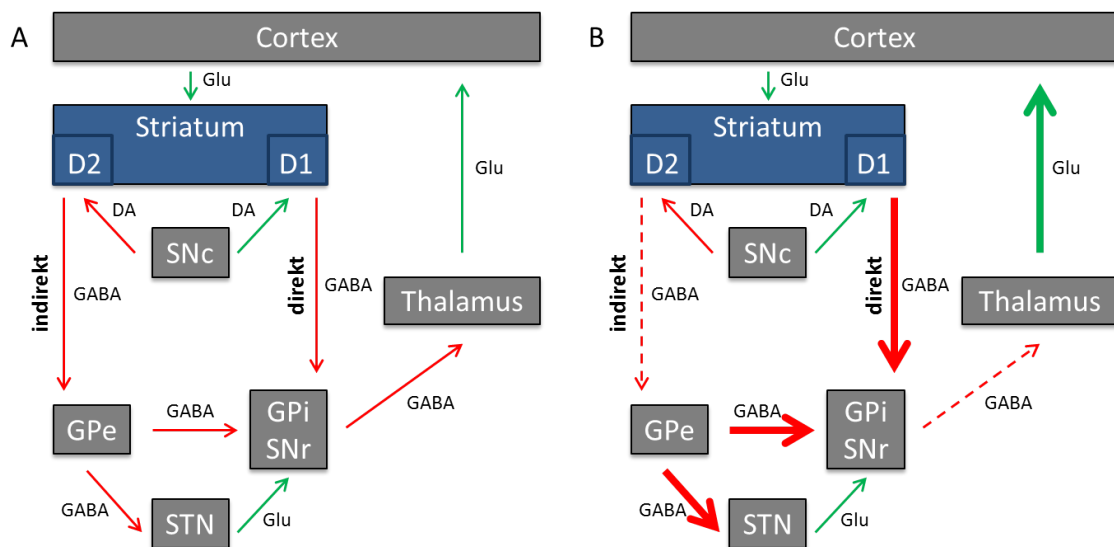


Abbildung 2: Schematische Darstellung wichtiger Verbindungen innerhalb der Basalganglien (A) und Hypothese zur Entstehung von Dystonien (B). Grüne Pfeile symbolisieren exzitatorische Signalwege und rote Pfeile inhibitorische. Im physiologischen Zustand (A) sind direkter und indirekter Weg in der Balance. Dickere Pfeile zeigen erhöhte und gestrichelte Pfeile verminderte neuronale Aktivität (B). Weitere Erläuterungen siehe Text. DA: Dopamin, D1: Dopamin D1-Rezeptor, D2: Dopamin D2-Rezeptor, GABA: γ -Aminobuttersäure, GPe: Globus pallidus externus, GPI: Globus pallidus internus, SNc: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata, STN: N. subthalamicus. Modifiziert nach (Tanabe et al., 2009).

Eine gängige Hypothese zur Pathophysiologie von Dystonien ist, dass eine Fehlfunktion in der Regulation der beiden Wege vorliegt (Abb. 2B). Diese Fehlfunktion im STR führt zu einer erhöhten Aktivität des direkten Weges, damit zur vermehrten Hemmung des GPI bzw. EPN und somit zur Enthemmung des TH. Die thalamocortikale Rückkopplungsschleife wird letztendlich überaktiviert. Durch die Überaktivität des direkten Weges kommt es zu einer verminderten Aktivität der Ausgangsstrukturen. Der indirekte Weg ist dagegen vermindert aktiv (Vitex and Giroux, 2000). Viele Befunde in Dystoniekranke und zahlreiche Ergebnisse früherer Untersuchungen in Dystoniemodellen sprechen für eine abnorme cholinerge Aktivierung der striatalen Projektionsneurone. Im nachfolgenden Kapitel soll die physiologische und pathophysiologische Rolle von Acetylcholin daher genauer beschrieben werden.

1.2 Physiologie und pathophysiologische Bedeutung von Acetylcholin

1.2.1 Acetylcholin und seine Rezeptoren

Acetylcholin (ACh) ist der Botenstoff des parasympathischen Nervensystems und Transmitter an der neuromuskulären Endplatte. Im Zentralen Nervensystem (ZNS) spielt ACh eine ebenso bedeutende Rolle für Motorik, Kognition und Verhalten (Woolf

and Butcher, 2011). Dabei ist das cholinerge System innerhalb der Basalganglien für die Kontrolle der Motorik verantwortlich.

ACh wird im STR von Interneuronen (ChI) gebildet und ausgeschüttet (Calabresi et al., 2000; Zhou et al., 2002). Es wird aus Cholin und Acetyl-Coenzym A durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert. In der Präsynapse wird es in Vesikeln gespeichert. Kommt ein Aktionspotential in der Präsynapse an, wird ACh nach vorherigem Ca^{2+} -Einstrom in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Dort löst ACh an nicotinergen (nAChR) oder muskarinergen (mAChR) Acetylcholinrezeptoren eine Signalkaskade aus oder wird durch das Enzym Acetylcholinesterase zu Cholin und Acetat abgebaut. Cholin wird über Na^{+} -gesteuerte Ionenkanäle wieder in die Präsynapse aufgenommen.

Ionotope nAChR sind pentamerische, liganden-abhängige Ionenkanäle, die aus fünf Untereinheiten bestehen. Sie sind im Nervensystem weit verbreitet, wobei sie hauptsächlich in präsynaptischen Endigungen vorkommen (Zhou et al., 2002). Im STR werden sie vor allem in präsynaptischen dopaminergen Endigungen und in fast-spiking (FS) Interneuronen (IN) exprimiert (Koós and Tepper, 2002; Zhou et al., 2002). Nach einer Bindung von ACh an den Rezeptor kommt es zu einer Öffnung des Na^{+} - und K^{+} -Ionenkanals. Dies führt zu einer Depolarisation der prä- und postsynaptischen Membran (Albuquerque et al., 2009). Im ZNS spielen nAChR eine wichtige Rolle beim Lernprozess und bei der Gedächtnisbildung und neuronalen Entwicklung (Jones et al., 1999).

Metabotrope mAChR gehören zur Familie der Guanin-bindenden Protein (G-Protein) gekoppelten Rezeptoren (Abb. 3) (Caulfield and Birdsall, 1998). Bislang wurden fünf verschiedene Subtypen (M1 bis M5) sequenziert. In Maus, Ratte und Mensch konnte eine Überschneidung in der pharmakologischen Reaktion und Sequenzhomologie von allen Subtypen nachgewiesen werden (Caulfield and Birdsall, 1998; Bymaster et al., 2003). Allen Subtypen gemein sind ihre sieben transmembranären Domänen, die als ringförmige Struktur angeordnet sind und sich durch die Plasmamembran ziehen. Sie bilden eine α -Helixstruktur und verfügen über drei interne und drei externe Schleifen (Hulme et al., 1990). Diese Anordnung dient als orthostatische Bindungsstelle für ACh (Baldwin, 1994). Da die Aminosäuresequenzen bei M1 bis M5 nahezu übereinstimmen und alle mAChR Subtypen diese Sequenz innehaben, lassen sich subspezifische Liganden kaum entwickeln (Caulfield and Birdsall, 1998). Es erschwert die genaue Lokalisation der einzelnen Rezeptor-Subtypen und damit die Aufklärung ihrer Rolle

und Funktion bei neurologischen Erkrankungen (Servent and Fruchart-Gaillard, 2009). Bindet ACh am Rezeptor, kommt es zur Aktivierung von G-Proteinen, die aus drei Untereinheiten (UE) bestehen (α , β und γ). Dabei kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors, wobei Guanosintriphosphat zu Guanosindiphosphat an der α -UE umgewandelt wird. Gleichzeitig wird die $\beta\gamma$ -UE abgespalten und die nachfolgende Signaltransduktionskaskade ausgelöst (Caulfield, 1993).

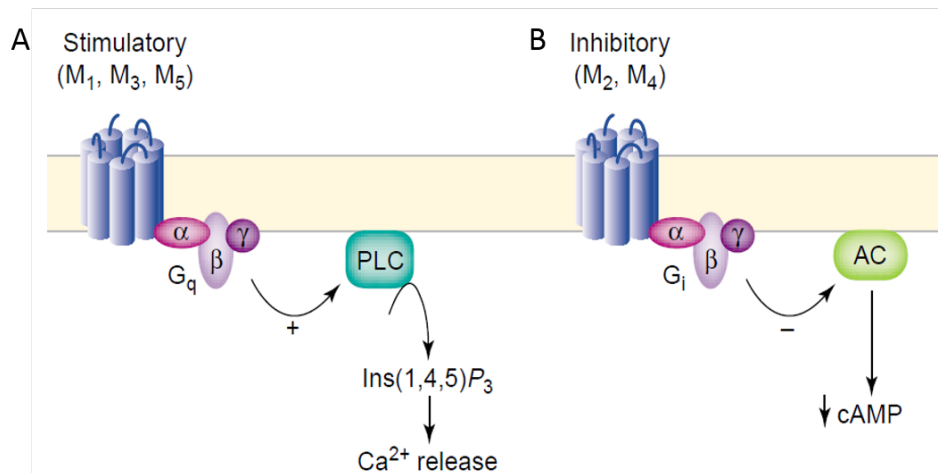


Abbildung 3: Muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren und ihre Subtypen M1 bis M5. AC: Adenylatcyclase, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, InsP₃: Inositoltriphosphat, PLC: Phospholipase C, Gi/Gq: inhibitorisches/PLC aktivierendes G-Protein. Aus Eglen et al. (2001).

Man unterscheidet zwei große Gruppen von mAChR: (Abb. 3A) die exzitatorischen M1-ähnlichen Rezeptoren M1, M3 und M5 sowie (Abb. 3B) die inhibitorischen M2-ähnlichen Rezeptoren M2 und M4. Die Rezeptoren M1, M3 und M5 sind an Gq-Proteine gekoppelt und aktivieren die Phospholipase C (Hulme et al., 1990). Dabei kommt es zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). IP₃ führt zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺, während DAG nach Aktivierung der Proteinkinase C zur Phosphorylierung von Zellproteinen führt (Nishizuka, 1984; Felder et al., 2000). Die inhibitorischen M2-ähnlichen Rezeptoren M2 und M4 sind an Gi/o-Proteine gekoppelt. Es kommt zur Inhibition der Adenylatcyclase und damit zur Reduktion der cyclischen Adenosinmonophosphat-Konzentration (Hulme et al., 1990; Felder et al., 2000).

Die mAChR sind sie im ZNS in Funktionen wie der Temperaturregelung, Gedächtnisfunktion und motorischen Kontrolle involviert (Caulfield and Birdsall, 1998). Die mAChR Subtypen sind zahlreich in verschiedenen Gehirnregionen

exprimiert. Nur der M5-Rezeptor findet sich in geringer Dichte im Gehirn. Sie werden hauptsächlich auf GABAergen Projektionsneuronen (Medium Spiny Neurons (MSN)), GABAergen IN und cholinergen IN (ChI) exprimiert. Der M1-Rezeptor findet sich mit hoher Dichte im Neocortex und Hippocampus, der M2-Rezeptor im Hirnstamm und Cerebellum, der M3-Rezeptor im Hippocampus und der M4-Rezeptor vor allem im STR (Levey et al., 1991; Levey, 1993a; Hersch et al., 1994; Levey et al., 1994).

Die basale extrazelluläre ACh Konzentration wird im STR durch die Acetylcholinesterase und über M2 und M4 Autorezeptoren sowie D2R an den tonisch aktiven ChI geregelt (Calabresi et al., 1998). Im STR werden sowohl nAChR als auch die fünf Subtypen des mAChR exprimiert (Kreitzer, 2009). Der M1-Rezeptor ist auf allen Projektionsneuronen zu finden (Alcantara et al., 2001; Yan et al., 2001). M1-Rezeptoren auf Neuronen des indirekten Weges interagieren mit dem Adenosin A2A-Rezeptor (Alcantara et al., 2001), während ihre Funktion auf GABAergen IN ungeklärt ist. Der M4-Rezeptor kann auf den Projektionsneuronen des direkten Weges nachgewiesen werden (Bernard et al., 1992; Yan et al., 2001), wo sie mit dopaminergen D1-Rezeptoren coexprimiert werden. Auch auf glutamatergen Endigungen im CX (Pancani et al., 2014) und GABAergen IN (Bernard et al., 1998) werden M4-Rezeptoren nachgewiesen. Zusätzlich sind M4 Rezeptoren präsynaptisch auf ChI zu finden, wo sie einen negativen Feedbackmechanismus auf die ACh-Freisetzung ausüben (Pancani et al., 2014; Eskow Jaunarajs et al., 2015). Die M2-Rezeptoren sind präsynaptisch auf ChI exprimiert (Bernard et al., 1992). Zusammen mit dem M4-Rezeptor reguliert er als Autorezeptor die Ausschüttung von ACh (Alcantara et al., 2001). Weiterhin kommt der M2-Rezeptor auf glutamatergen Endigungen und GABAergen IN vor (Hersch et al., 1994; Bernard et al., 1998). Der M3-Rezeptor ist nur in geringer Anzahl vorhanden und befindet sich auf Projektionsneuronen des indirekten Weges (Yan et al., 2001). Auch der M5-Rezeptor ist nur gering exprimiert und ist mitverantwortlich für die Ausschüttung von Dopamin auf den dopaminergen Endigungen (Foster et al., 2014). Die nAChR sind auf Projektionsneuronen (Liu et al., 2007), corticostriatalen Afferenzen (Marchi et al., 2002), GABAergen fast-spiking IN (Koós and Tepper, 2002) und dopaminergen Neuronen der SN (Zhou et al., 2001) nachgewiesen worden.

1.2.2 Acetylcholin als Neurotransmitter in den Basalganglien

Nur etwa 1% aller Neurone im ZNS sind cholinerge Neurone (Woolf and Butcher, 2011). Von den drei wichtigen cholinergen Systemen im ZNS projizieren zwei

Teilsysteme weitläufig im Gehirn (schwarz dargestellt, Abb. 4). Zum einen handelt es sich um cholinerge Neurone aus dem basalen Vorderhirn, die den CX und Hippocampus innervieren. Im zweiten Teilsystem entspringen cholinerge Projektionen aus den Hirnstammkernen. Diese stimulieren sowohl dopaminerge Areale des Mittelhirns und den TH als auch absteigende Projektionen, welche zur kaudalen Pons und dem Hirnstamm führen (Everitt and Robbins, 1997; Schliebs and Arendt, 2006; Dani and Bertrand, 2007).

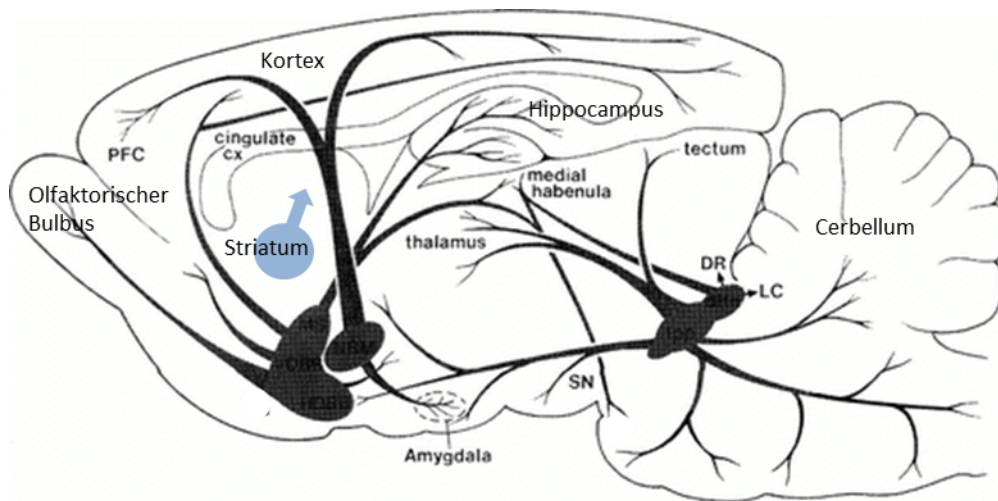


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Verteilung cholinergischer Neurone und ihrer Projektionen im Gehirn. CX: Cortex, PFC: präfrontaler Cortex, DR: dorsaler Raphekern, LC: Locus coeruleus, SN: Substantia nigra. Modifiziert nach Everitt and Robbins (1997).

Den dritten Teil bilden die cholinergen Interneurone (ChI) im STR (blau dargestellt, Abb. 4). Insgesamt liegen im STR nur 5% aller Neurone im Nager als IN vor (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi et al., 1995; Rymar et al., 2004), bei Primaten sind es möglicherweise bis zu 23% (Graveland et al., 1985b). Es sind vier Typen striataler IN beschrieben. Zu den ersten drei zählen GABAerge IN, in denen verschiedene Proteine wie Parvalbumin, Calretinin Somatostatin bzw. Neuropeptide Y co-exprimiert werden. Zur vierten Gruppe der IN gehören die ChI und diese machen nur 1-2% aller Neurone im STR aus (Zhou et al., 2002; Rymar et al., 2004).

Im STR sind ChI die Hauptquelle von ACh und haben einen Zellkörper mit einem Durchmesser von 20 bis 50 μm (Bolam et al., 1984; Kawaguchi, 1993). Ihr umfangreiches Netz aus Axonen und Dendriten (Kawaguchi, 1993) übt einen starken Einfluss auf striatale Funktionen aus (Zhou et al., 2002). Striatale ChI stehen in Interaktion mit dopaminergen Neuronen des Mittelhirns (Dimova et al., 1993), MSN (Smith and Bolam, 1990) und GABAergen IN (Chang and Kita, 1992). Die

Hauptverbindungen der Afferenzen und Efferenzen zwischen den ChI und dem MSN mit dem STR sind in Abb. 5A dargestellt. Cholinerge IN und MSNs werden durch verschiedene Neurotransmittersysteme beeinflusst (Abb. 5B). Sie erhalten glutamatergen Input aus dem CX und TH (Lapper and Bolam, 1992; Dimova et al., 1993; Doig et al., 2014) und beeinflussen sich gegenseitig, wobei beide Einfluss von dopaminergen Neuronen der SNc erhalten. Im Gegensatz dazu beeinflussen ChI auch die dopaminerge Transmission.

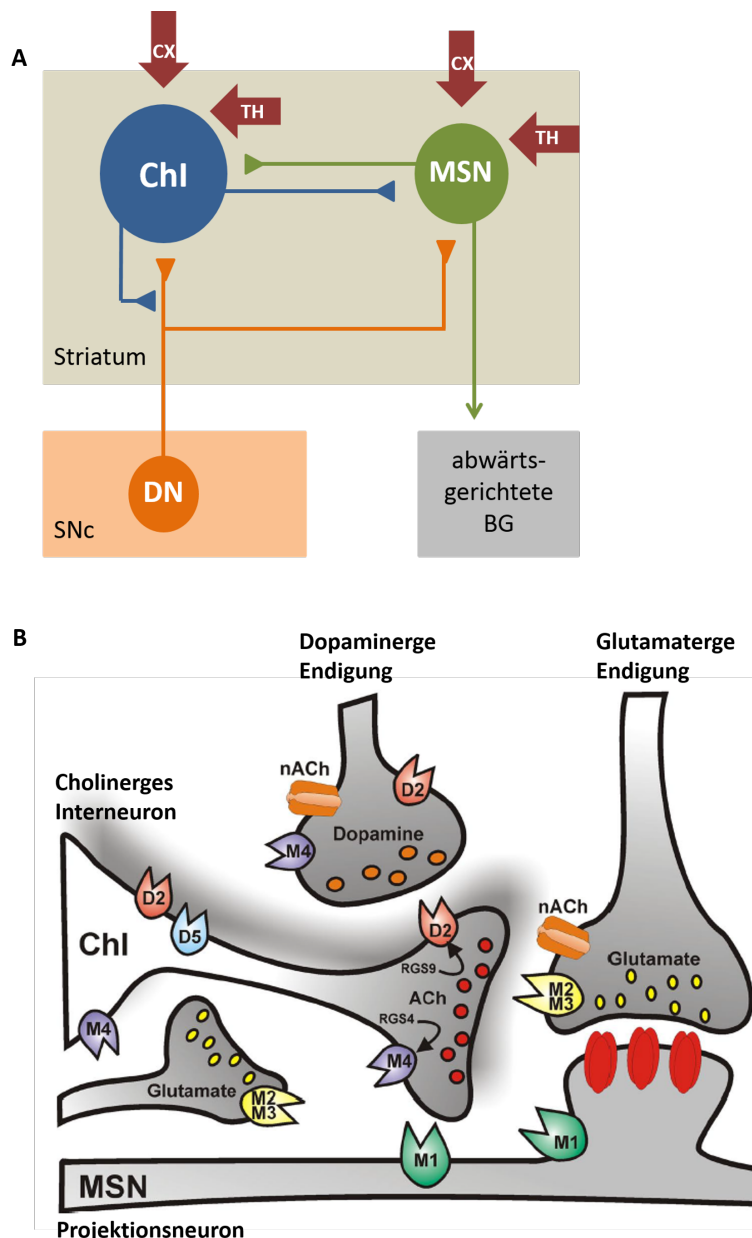


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Afferenzen und Efferenzen zwischen cholinergen Interneuronen (ChI) und Projektionsneuronen (MSN) des Striatums (A) sowie Interaktionen zwischen ChI und anderen Neurotransmittern im Striatum (B). Rote Pfeile repräsentieren glutamaterge Innervationen. Weitere Erläuterungen siehe Text. ChI: cholinerge Interneurone, MSN: Medium Spiny Neurons, CX: Cortex, TH: Thalamus, BG: Basalganglien, SNc: Substantia nigra pars compacta. ACh: Acetylcholin, D1, D2, D5: Dopamin D1-, D2- und D5-Rezeptor, nACh: nikotinerger Acetylcholinrezeptor, M1 bis M4: muskarinerges Acetylcholinrezeptor, ChI: cholinerges Interneuron, MSN: Medium Spiny Neuron. Modifiziert nach Bonsi et al. (2011) und Deffains and Bergman (2015).

Auf den ChI werden die dopaminergen Rezeptoren D2 und D5 exprimiert (Yan et al., 1997), die einen gegenteiligen Effekt auf die Aktivität des INs haben. Während der D5 Rezeptor zu einer vermehrten Aktivität führt, vermindert der D2-Rezeptor die Aktivität (Pisani et al., 2000). Mehr als 95% aller Neurone im STR sind Projektionsneurone (MSN) und innervieren direkt oder indirekt die Basalganglien-Ausgangsstrukturen (Kemp and Powell, 1971; Rymar et al., 2004). Auf allen MSN sind exzitatorische M1-Rezeptoren lokalisiert. Auf MSN des direkten Weges werden auch M4-Rezeptoren exprimiert. Obwohl M4-Rezeptoren allgemein eine postsynaptische Inhibition vermitteln, konnten Hernández-Flores et al. (2015) nachweisen, dass eine M4-Aktivierung durch den verstärkten Ca^{2+} -Einstrom am Ca_v1 -Kanal eine erhöhte Erregbarkeit der direkten Projektionsneurone bewirkt. Zusätzlich werden neben dem M4-Rezeptor auch D1-Rezeptoren und Neurotransmitter wie Dynorphin und Substanz P auf den direkten MSN exprimiert (vgl. Abb. 2) (Gerfen, 1992; Ince et al., 1997). Dabei regulieren D1-Rezeptoren Natrium-, Kalium und Calcium-Kanäle. Die MSN des indirekten Weges sind charakterisiert durch eine hohe Expression an D2- und A2A-Rezeptoren (Abb. 2) sowie einer guten Immunreaktivität für Enkephalin (Schiffmann et al., 1991; Gerfen, 1992). Es kommt zu einer Unterdrückung der Feuerungsrate der MSNs durch den D2-Rezeptor. In elektrophysiologischen Studien zeigen die striatonigralen und striatopallidalen MSN ähnliche Eigenschaften. Die direkten MSNs weisen eine erhöhte Erregbarkeit gegenüber den indirekten MSNs auf, wobei beide Subtypen von Dopamin und ACh moduliert werden (Shen et al., 2007; Surmeier et al., 2007).

Störungen in der cholinergen Funktion spielen in der Pathophysiologie verschiedener psychischer und neurologischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und der Huntington'schen Krankheit eine Rolle (Graveland et al., 1985a; Obeso et al., 2000; Lucas-Meunier et al., 2003; Wichmann and DeLong, 2003; Augood et al., 2004). Die Hypothese, dass Fehlfunktionen der striatalen ChI bei der DYT1 Dystonie von zentraler Bedeutung sein könnte, basiert vor allem auf *ex vivo* elektrophysiologischen Untersuchungen in DYT1 Tiermodellen (Eskow Jaunarajs et al., 2015). Bestätigung hierfür wird in der beobachteten Wirksamkeit von Anticholinergika bei DYT1 Patienten gesehen (Jankovic, 2013). Außerdem können ACh-Rezeptoragonisten gelegentlich dystone Symptome auslösen (Casey et al., 1980; Shafrir et al., 1986). Da postmortales Gehirngewebe von Dystoniepatienten infolge Autolyse nicht für neurochemische Untersuchungen geeignet ist (Hornykiewicz, 1989) und auch

bildgebende Verfahren fehlen (Hornykiewicz, 1989), stützt sich die Hypothese cholinergischer Fehlfunktionen auf Befunde in Tiermodellen. An Mausmodellen und einem Rattenmodell für DYT1 wurde an Hirnschnitten eine paradoxe D2R-vermittelte Aktivierung von ChI nachgewiesen (Eskow Jaunarajs et al., 2015). Mikrostrukturelle Untersuchungen zeigen, dass in DYT1 KI Mäusen eine Vergrößerung der ChI und eine erhöhte Dichte an ChI im dorsolateralen STR vorliegt (Song et al., 2013). Kürzlich wurde von Scarduzio et al. (2017) mittels Mikrodialyse eine Erhöhung der extrazellulären ACh Spiegel im STR von DYT1 KI Mäusen nachgewiesen. Optogenetische Stimulationen cholinergischer Interneurone im STR der DYT1 Maus zeigten auch im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine induzierte Hyperlokomotion und abweichende neuronale Aktivierungen im STR (Baldeweg, 2018). Abgesehen von Untersuchungen in der *dt^{sz}* Hamstermutante, als Modell für eine paroxysmale Dystonie (Hamann et al., 2017), gibt es bislang jedoch keine Untersuchungen zur Expression von ACh-Rezeptoren.

2 Aufgabenstellung

Um die Pathophysiologie der Dystonie aufzuklären und damit mögliche Zielstrukturen für Therapeutika entwickeln zu können, sind Tiermodelle von enormer Bedeutung. Zahlreiche Befunde an Tiermodellen (Richter and Richter, 2014) als auch am Menschen (Ozelius et al., 2011) deuten auf eine Fehlfunktion der Basalganglien in der Pathogenese der Dystonie hin. Bisher wurden einige genetische Tiermodelle für die DYT1 entwickelt, die eine hohe „construct validity“ für diese Form der Dystonie aufweisen. Elektrophysiologische Studien zeigen eine Fehlfunktion der cholinergen Interneurone (ChI) im STR, welches die Eingangsstruktur der Basalganglien darstellt. Eine Erklärung für fehlgesteuerte Bewegungsmuster könnte sein, dass der D2-Rezeptor im Gegensatz zu seiner normalen inhibitorischen Funktion eine vermehrte Feuerungsrate in ChI auslöst. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität von Projektionsneuronen (Eskow Jaunarajs et al., 2015). Die cholinerge Transmission über striatale M1- und M4-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der motorischen Kontrolle (Pisani et al., 2007; Eskow Jaunarajs et al., 2015; Ztaou et al., 2016), sind jedoch in den DYT1 Modellen bislang nicht erforscht. Um aufzuklären, ob auf Rezeptorebene Veränderungen von Rezeptoren im DYT1 Modell vorliegen, sollte die Expression der M1- und M4-Rezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen in DYT1 KI Mäusen untersucht werden.

Zunächst sollen auf Proteinebene die Expressionsmuster der M1- und M4-Rezeptoren im STR von DYT1 KI Mäusen und deren Wildtyptieren mit immunhistochemischen Methoden dargestellt werden. Während M1-Rezeptoren zum größten Teil nur postsynaptischen auf GABAergen Projektionsneuronen (MSN) vorkommen, sind M4-Rezeptoren sowohl postsynaptischen auf direkten MSNs als auch präsynaptischen auf ChI (zusammen mit dem M2-Rezeptor als Autorezeptor) zu finden. Um M4-Rezeptoren auf ChI nachzuweisen, sollte eine immunhistochemische Doppelfärbung (Ko-Labeling) mit der cholinergen Acetyltransferase (ChAT) durchgeführt werden. ChAT findet sich in ChI, wo Cholin zu ACh transferiert wird. Um M4-Rezeptoren auf MSN zu untersuchen, ist Substanz P zur Ko-Markierung geeignet, da Substanz P von direkten MSN exprimiert wird (Yung et al., 1996).

Durch Bestimmung der mRNA Gehalte der mAChR M1, M2, M3 und M4 mittels qPCR lassen sich Genexpressionsprofile erstellen. Konzentrationsunterschiede im STR, Cerebellum, präfrontalem und motorischen CX in beiden Mausgenotypen sollten Aufschluss geben über die Verteilung und Unterschiede der Rezeptoren in diesen

Gehirnregionen. Eine Untersuchung auf Protein- und mRNA-Ebene ist sinnvoll, um Zusammenhänge in Bezug auf die Expressierung von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren darzustellen, da die Menge an mRNA nicht unbedingt mit der Menge an exprimiertem Protein korreliert. Daraus lassen sich weitere Erkenntnisse zu Expressionsmustern der Rezeptoren im Gehirn treffen. Somit können weitere pathophysiologische Erklärungen zur Entstehung der DYT1 Dystonie getroffen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere sowie die molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Universität Leipzig, Leipzig. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich an geschnittenem oder gefrorenem Gehirnmateriale durchgeführt, welches noch aus vorherigen *in vivo* Versuchen verblieben war (genehmigt unter TVV 20/13, Landesdirektion Sachsen).

3.1.1 DYT1 knock-in Mausmodell

Die Versuche wurden in männlichen, heterozygoten DYT1 knock-in Mäusen (DYT1 KI) und deren Wildtypgeschwistern mit C57BL6/J-Hintergrund im Alter zwischen 4 und 7 Monaten durchgeführt. In die DYT1 KI Linie ist die humane DYT1-Mutation in das Maus-Tor1a Gen eingebracht worden. Die institutseigene Zucht erfolgte durch eine männliche transgene Maus, die von Dr. William Dauer, University of Michigan (Michigan, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Tierzahlen sind der Tab. 1 zu entnehmen. Da die Gehirne der Mäuse teils für mehrere Markierungen verwendet werden konnten, wurden insgesamt 6 DYT1 KI Mäuse und 6 Kontrollmäuse (Wildtyp) verwendet.

Tabelle 1: Gesamttierzahl. IHC = Immunhistochemie, ChAT = choline Acetyltransferase, M1/M4 = muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren Subtypen 1/4, RT-qPCR = quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion, Sub P = Substanz P.

Methode	Parameter	Wildtyptiere	DYT1 KI Tiere
IHC M1	naive Tiere	6	6
IHC M4	naive Tiere	6	6
IHC M4 + ChAT	Etablierung	-	2
	naive Tiere	6	6
IHC M4 + Sub P	Etablierung	-	2
	naive Tiere	6	6
RT-qPCR		6	6

3.1.2 Fütterung und Haltung

In den Räumen der institutseigenen gentechnischen Anlage (S1, Landesdirektion Sachsen, AZ: 55-8811.71/244) erfolgte die Haltung und Zucht der Mäuse unter folgenden Standardbedingungen: zwölfständiger Hell-Dunkel-Rhythmus mit Dunkelphase von 11:00 bis 23:00 Uhr, Raumtemperatur $24 \pm 1^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $40 \pm 5\%$. Die Tiere wurden am 21. Lebenstag vom Muttertier abgesetzt, genotypisiert (siehe 3.3.1) und in Gruppen von zwei bis fünf Tieren in Makrolonkäfigen vom Standardtyp III auf Einstreu für Labortiere (Firma Altromin, Deutschland) gehalten. Trinkwasser und Standardfutter für Nager (Firma Altromin, Deutschland) standen ad libitum zur Verfügung. Weiterhin wurden Hobelspäne (ABH von AsBe-wood, Deutschland), Papphäuschen und Zellstoff als „Environmental Enrichement“ angeboten.

3.2 Material

I. Für die Genotypisierung wurden folgende Kits und Substanzen verwendet:

1. 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
2. Nuclease-free water (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
3. puReTaq Ready-To-Go PCR Bead (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)
4. Primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
 - a. DYT1 KI: Primer forward (5' - AGTCTGTGGCTGGCTCTCCC), Primer reverse (3' - CCTCAGGCTGCTCACAACCAC)
 - b. Cre: Primer forward (5' - CCTTCTATCGCCTTCTTGACG), Primer reverse (3' - AGATAGATAATGAGAGGCTC)
 - c. Chr2: Primer forward (5' - TACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA), Primer reverse (3' - CAGGCGAGCAGCCAAGGAAA)

II. Für die Immunhistochemie (IHC) kamen folgende Antikörper (AK) zur Verwendung:

1. primäre AK:
 - Ziegen Anti-Choline Acetyltransferase IgG (Polyklonal, AB144P Millipore, Darmstadt, Deutschland)
 - Kaninchen Anti-Substance P IgG (Polyklonal, AB1566, Millipore, Darmstadt, Deutschland)

- Maus Anti-M4 IgG (Monoklonal, MAB1576, Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Kaninchen Anti-M1 IgG (Polyklonal, AB5614, Millipore, Darmstadt, Deutschland)

2. sekundäre AK:

- AlexaFluor 488 AffiniPure Esel Anti-Ziege IgG (H+L; 705-545-147)
- AlexaFluor 488 AffiniPure Esel Anti-Maus IgG (H+L; 711-545-150)
- AlexaFluor 488 AffiniPure Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L, 711-545-152)
- AlexaFluor 594 AffiniPure Esel Anti-Maus IgG (H+L, 715-585-150)
- AlexaFluor 594 AffiniPure Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L, 711-585-152)

III. Weitere Reagenzien wurden für die IHC verwendet:

- Normales Eselserum (normal donkey serum, NDS; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK)
- Tissue-Tek O.T.C. (Sakura Finetek Germany, Staufen, Deutschland)
- Vectashild Antifade Mounting Medium, H-1000 (Vector laboratories, Burlingame, USA)

IV. Für die Untersuchungen der mRNA-Expression wurden folgende Kits und Substanzen verwendet:

- Nuklease-freies Wasser (Ambion, ThermoFischer Scientific, Gaithersburg, USA)
- RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland)
- Premix Ex Taq (Probe qPCR) Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)
- PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)
- Taq-Man Gene expression assays (Applied biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA):
 - Chrm1 (Mm00432509)
 - Chrm4 (Mm00432514)
 - Chrm2 ((Mm01701855)

- Chrm3 (Mm00446300)
- Gapdh (Mm99999915, house-keeping Gen)
- Hprt (Mm01545399, house-keeping Gen)
- Eif4a2 (Mm00834357, house-keeping Gen)
- Atp5b (Mm00443967, house-keeping Gen)

Weitere Chemikalien, Geräte und spezielle Reagenzien für die Molekularbiologie und IHC sind im Anhang aufgelistet.

3.3 Methoden

3.3.1 Genotypisierung von DYT1 KI Mäusen

Die Versuchstiere wurden nach dem Absetzen genotypisiert. Ein Gewebestück vom Ohr (mit dem Schneiden der Ohrmarkierung gewonnen) wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Anschließend wurde eine Extraktion im Hitzeblock bei 95°C mit 200 µl 50 mM Natronlauge durchgeführt. Nach 20 Minuten (min) wurden 20 µl Tris-HCl zugegeben, die Probe kurz gevortext und bei 13.000 u/min für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß (200 µl) überführt und bei -20°C gelagert. Die Durchführung der PCR entspricht den Protokollen von Linda Madisen (Allen Institute for Brain Science, Washington, USA), Tanabe et al. (2012) und The Jackson Laboratory (Maine, USA). Ein 24 µl Ansatz wurde für die Bestimmung der DYT1 KI Gene hergestellt: 21,5 µl Nukleasefreies Wasser, 1,25 µl Primer forward und 1,25 µl Primer reverse. Dieser Ansatz wurde zu dem puReTaq Ready-To-Go PCR Bead mit 1 µl DNA der jeweiligen Probe hinzugegeben. Die Proben wurden im Thermocycler (Thermocycler Gene AMP PCR System 9700, GeneAMP PCR System 9700 Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit folgendem Programm analysiert:

1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 1 min
2. 37 Wiederholungen aus:
 - Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden (sec),
 - Annealing (Anlagerung der Primer an die DNA) bei 68°C für 30 sec
 - Elongation (Bildung des neuen DNA-Stranges) bei 72°C für 30 sec.
3. Extensionsschritt bei 72°C für 10 min
4. Abkühlung auf 4°C.

Mittels Gelelektrophorese fand die Auftrennung der DNA statt. Hierzu wurde eine Elektrophorese-Kammer in einem Puffer aus 1%igem Agarosegel verwendet. Nach Zugabe von 24 µl Gelred Nucleic Acid Stain (Biotium, Fremont, Kalifornien, USA) zur Sichtbarmachung der Banden, wurde das Gel in die Gelkammer (Bio-Rad, Hercules, USA) gegossen. Zur Bildung der Taschen wurde ein Kamm eingesetzt. Die PCR-Proben wurden mit 4,5 µl 6xDNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt, kurz gevortext und zentrifugiert. Neben einer DNA-Leiter (GeneRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zum Größenabgleich der Basenpaare wurden dann 7 µl der Proben in die Gelkammern gegeben. Die Elektrophoresekammer (Sub-Cell, Model 192, Bio-Rad, Hercules, USA) war für 90 bis 120 min an eine Stromquelle bei konstanter Spannung von 90 Volt angeschlossen (PowerPac Basic, 300 V, 400 mA, 75 W, Bio-Rad, Hercules, USA). Anschließend konnten die Banden mittels eines UV-Schirms und einer Kamera (VWR GenoSmart, VWR, Radnor, USA) sichtbar gemacht und über einen USB-Stick gespeichert werden. Am Computer wurden die Bilder später ausgedruckt und ausgewertet.

3.3.2 Etablierung einer immunhistochemischen Färbung von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) an Mausgehirnen

Um die Gehirne für die IHC nutzen zu können, wurden die Tiere vorher perfundiert. Dafür wurden sie mit einer Überdosis Pentobarbital (100 mg/kg KGW i.p.) in tiefe Narkose versetzt. Nach Aussetzen der Atmung, des Herzschlages und der Tiefensensibilität wurden die Tiere in gestreckter Haltung auf dem Rücken fixiert, die Brusthöhle ist mit einer Schere geöffnet und der linke Herzventrikel mit einer Knopfkanüle punktiert. Nach Befestigung der Knopfkanüle wurde das rechte Herzzohr geöffnet und der Blutkreislauf mit 0,1 molarer PBS Lösung (pH 7,4, Herstellung siehe Anhang) gespült. Danach erfolgte eine Perfusion mit phosphatgepufferter 4%-iger Paraformaldehydlösung (pH 7,4, Herstellung siehe Anhang). Die Gehirne wurden entnommen und über Nacht bei 4°C in phosphatgepuffertem 4%-igen Paraformaldehyd gelagert. An drei aufeinander folgenden Tagen überführte man die Gehirne zur Vermeidung von Gewebeschäden in eine aufsteigende phosphatgepufferte Zuckerlösung von 10 bis 30% (Herstellung siehe Anhang). Im Anschluss fand im Trockeneis eine Schnellgefrierung der Gehirne statt, welche dann bei -80°C zwischengelagert wurde. In einem Kryostaten (Hypax C 50, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden bei -18°C 40 µm dicke Transversalschnitte angefertigt und in einer

Gefrierschutzlösung (Herstellung siehe Anhang) bei -20°C gelagert. Die benötigte Schnitte für die IHC wurden in TBS-Puffer (Herstellung siehe Anhang) überführt. Alle Markierungen wurden an freischwimmenden Schnitten in 24-Well Platten mit jeweils zwei medialen STR-Schnitten pro Well durchgeführt. Die Auswahl der Schnitte erfolgte nach dem stereotaktischen Atlas der Maus von Paxinos and Franklin (2012). Zu jeder IHC wurde mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der kein primärer Antikörper (AK) verwendet wurde, sondern lediglich die Trägerlösung. Eine Inkubation erfolgte auf einem Orbitalschüttler (SeaStar, Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA). Es wurden je sechs DYT1 KI Mäuse und sechs Kontrolltiere (WT; C57BL6/J) für die Färbungen verwendet. Triton X-100 (TX, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde zur Erhöhung der Zellpermeabilität hinzugefügt und Normal Donkey Serum (NDS) diente zur Blockierung unspezifischer Bindungen.

3.3.2.1 Immunhistochemische Überprüfung der M1 Expression im Mausgehirn

Die Auswahl der AK gegen den M1-Rezeptor (Rabbit Anti-M1 IgG, Millipore, Darmstadt, Deutschland) und der getesteten Konzentration erfolgte in Anlehnung an die Publikation von Hamann et al. (2017). Es wurden zwei Inkubationszeiten (24 und 48 Stunden, h) des primären AK an jeweils zwei Schnitten des STRs getestet. Folgendes Protokoll wurde erarbeitet:

1. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
2. Blocken: 10% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei Raumtemperatur (RT)
3. Inkubation mit primärem AK: 1:100
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 24 h bei 4°C
4. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
5. Inkubation mit sekundärem AK: 1:600
Alexa Fluor 594 AffiniPure Esel Anti-Rabbit IgG
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
6. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
7. Aufziehen und Eindecken mit Vectashield Antifade Mounting Medium, H-1000
8. Lagerung im Dunkeln bei 4°C.

Die Auswertung der Färbeintensität der fluoreszenzmarkierten Schnitte erfolgte anhand einer Intensitätsmessung. Alle Objektträger waren verblindet (kodiert). Mit Hilfe des Axioskop II Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden unter Verwendung

der 40-fachen Vergrößerung Fotos erstellt. Hierbei wurden die Belichtungsparameter konstant gehalten. Das Mikroskop wurde mit der gekoppelten Stereoinvestigator Software (MBF Bioscience, Williston, USA) gesteuert. Das STR wurde in Anlehnung an den stereotaktischen Atlas von Paxinos and Watson (2013) in vier Quadranten/Subregionen (Abb. 6) aufgeteilt und anschließend Fotos von der linken und rechten Gehirnhälfte erstellt. Außerdem wurden Fotos vom motorischen CX und Cerebellum gemacht. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ vl. 47 (Freie Software vom National Institut of Health, USA) und pro Bild wurde eine ca. 4 cm x 4 cm große Bildfläche ausgewertet. Eine Umrandung des Bildes wurde freihändig vorgenommen, wobei Artefakte, Blutgefäße und Fasern der Capsula interna exkludiert wurden. Die Größe des Bildes betrug im Durchschnitt ca. 35.000 Pixel². Den Bildpunkten der Fotos wurden in Abhängigkeit von der Intensität des rot fluoreszierenden AK Pixelwerte von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) zugeordnet. Die Regeln und Grundsätze zur Auswertung wurden von Bankhead (2014) abgeleitet. Erst danach wurde die Kodierung der Objektträger aufgelöst.

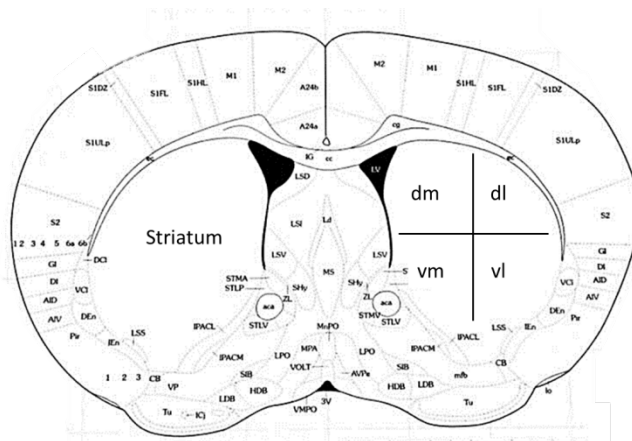


Abbildung 6: Transversalschnitt eines Mausgehirns. Aufteilung des Striatums in den dorsomedialen (dm), dorsolateralen (dl), ventromedialen (vm) und ventrolateralen (vl) Bereich. Modifiziert nach (Paxinos and Franklin, 2012).

3.3.2.2 Immunhistochemische Färbung der M4-Rezeptoren im Mausgehirn

Die Auswahl der AK gegen den M4-Rezeptor (Mouse Anti-M4 IgG, Millipore, Darmstadt, Deutschland) und der getesteten Konzentration erfolgte ebenfalls in Anlehnung an Hamann et al. (2017). Es wurden zwei Inkubationszeiten (24 und 48 h) und zwei Konzentrationen (1:500 und 1:200) des primären AK an jeweils zwei Schnitten des STRs getestet. Nach der Etablierung wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
2. Blocken: mouse-on-mouse Block, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
3. Inkubation mit primärem AK: 1:500
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 48 h bei 4°C
4. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
5. Inkubation mit sekundärem AK: 1:600
AlexaFluor 488 AffiniPure Esel Anti-Maus IgG
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
6. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
7. Aufziehen und Eindecken mit Vectashield Antifade Mounting Medium, H-1000
8. Lagerung im Dunkeln bei 4°C.

Auch hier erfolgte eine Auswertung mittels Intensitätsmessung der Fluoreszenz (s. 3.3.2.1).

3.3.2.2.1 Immunhistochemische Überprüfung der M4 Expression auf cholinergen Interneuronen (ChI) mittels ChAT

Um den (präsynaptischen) M4-Rezeptor auf ChI zu identifizieren, wurde mit ChAT eine Doppelfärbung durchgeführt. Es wurde der gleiche primärer AK gegen M4 wie unter 3.3.2.2 beschrieben verwendet. Die Auswahl der AK gegen ChAT (Goat Anti-Choline Acetyltransferase IgG, Millipore, Darmstadt, Deutschland) und der getesteten Konzentration erfolgte in Anlehnung an Pienaar et al. (2015) und Saunders et al. (2015). Es wurden zwei Konzentrationen (1:500 und 1:200) des primären AK gegen ChAT sowie zwei Konzentrationen (1:600 und 1:500) des sekundären AK gegen den M4-Rezeptor an jeweils zwei Schnitten des STR getestet. Folgendes Protokoll wurde erarbeitet:

1. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
2. Blocken: 10% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
3. Blocken: mouse-on-mouse Block, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
4. Inkubation mit primärem AK: für M4: 1:200, für ChAT: 1:500
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 48 h bei 4°C
5. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min

6. Inkubation mit sekundärem AK:

für M4 1:500 (AlexaFluor 594 AffiniPure Esel Anti-Maus IgG)

für ChAT: 1:800 (AlexaFluor 488 AffiniPure Esel Anti-Ziege IgG)

Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei RT

7. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min

8. Aufziehen und Eindecken mit Vectashield Antifade Mounting Medium, H-1000

9. Lagerung im Dunkeln bei 4°C.

Die Färbeintensität einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen wurde anhand einer Bildanalyse (Unterschiede in der Fluoreszenzintensität) gemessen. Die einzelnen Zellen wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskops (Olympus Fluoview FV 1200, Hamburg, Deutschland) unter Verwendung der 40-fachen Vergrößerung gescannt. Das Mikroskop wurde mit der gekoppelten Software Olympus Fluoview 4.1 (Olympus, Hamburg, Deutschland) gesteuert. Die Laser- und Belichtungsparameter wurden hierbei konstant gehalten. Das STR wurde in Anlehnung an den stereotaktischen Atlas von Paxinos and Watson (2013) in vier Quadranten aufgeteilt (Abb. 6). Es wurden je 1-3 Fotos pro Region gemacht, um im dl STR 5-9, im dm STR 2-4 und im vl und vm STR 1-3 ChI auszuwerten. Pro 0,3 cm x 0,3 cm großem Bild (im Durchschnitt 32.000 Pixel/cm) wurden die ChI freihändig umrandet, deren Nukleus exkludiert und den Bildpunkten der Fotos in Abhängigkeit von der Intensität des rot und grün fluoreszierenden AK Pixelwerte von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) zugeordnet. Die Regeln und Grundsätze zur Auswertung wurden von Bankhead (2014) abgeleitet.

3.3.2.2.2 Immunhistochemische Überprüfung der M4-Expression auf Projektionsneuronen (MSN) mit Substanz P

Um den (postsynaptischen) M4-Rezeptor auf Projektionsneuronen zu identifizieren, wurde mit Substanz P (Sub P) eine Doppelmarkierung durchgeführt. Es wurde der gleiche primäre AK für M4 wie unter 3.3.2.2 beschrieben verwendet. Die Auswahl des AK gegen Sub P (Rabbit Anti-Substance P IgG, Millipore, Darmstadt, Deutschland) erfolgte in Anlehnung an Fusco et al. (2003). Es wurden zwei Konzentrationen (1:500 und 1:200) des primären AK gegen Sub P sowie zwei Konzentrationen (1:600 und 1:500) des sekundären AK gegen den M4-Rezeptor an jeweils zwei Schnitten des STRs getestet. Daraus ergab sich folgendes Protokoll:

1. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min

2. Blocken: 10% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei RT

3. Blocken: mouse-on-mouse Block, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
4. Inkubation mit primärem AK: für M4 1:200
für Sub P 1:500
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 48 h bei 4°C
5. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
6. Inkubation mit sekundärem AK:
für M4 1:500 (AlexaFluor 594 AffiniPure Esel Anti-Maus IgG)
für Sub P: 1:600 (AlexaFluor 488 AffiniPure Esel Anti-Kaninchen IgG)
Trägerlösung: 2% NDS und 0,5% TX in TBS, 250 µl pro Well, 1 h bei RT
7. 3x Waschen mit je 1 ml TBS für 10 min
8. Aufziehen und Eindecken mit Vectashield Antifade Mounting Medium, H-1000
9. Lagerung im Dunkeln bei 4°C

Auch hier erfolgte eine Auswertung mit Hilfe des Konfokalmikroskops (s. 3.3.2.2.1.). Das STR wurde in Anlehnung an den stereotaktischen Atlas von Paxinos and Watson (2013) in vier Quadranten aufgeteilt (Abb. 6) und die darin befindlichen Zellen fotografiert. Es wurde je ein Bild pro Region für M4 (rot) und Sub P (grün) angefertigt. Die Auswertung der übereinandergelegten roten und grünen Bilder erfolgte mit ImageJ vl. 47 (Freie Software vom National Institut of Health, USA). Die 0,3 cm x 0,3 cm großen Bilder besaßen im Durchschnitt 32.000 Pixel/cm. Es wurden pro Region und Tier 6-7 (für Sub P positive) Neurone ausgewählt und deren Umrandung freihändig vorgenommen. Den Bildpunkten der Fotos wurden in Abhängigkeit von der Intensität des rot und grün fluoreszierenden AK Pixelwerte von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) zugeordnet. Die Regeln und Grundsätze zur Auswertung wurden von Bankhead (2014) abgeleitet.

3.3.3 Untersuchungen der mRNA Expression von mAChR mittels quantitativer real-time PCR (RT-qPCR)

3.3.3.1 Probenpräparation

Die Präparation erfolgte im Kryostaten (Hypax C50, Zeiss, Jena, Deutschland) bei ca. -20°C. Der Tissue-Tek Block, in dem das Gehirn eingebettet war, wurde mit einer Mikrotomklinge in Form geschnitten, sodass das Gehirn nur wenige mm vom Tissue-Tek eingerahmt war. Mit Hilfe des stereotaktischen Atlas der Maus (Paxinos and Franklin, 2012) wurden dünne Schnitte mit der Mikrotomklinge (ca. 1 mm groß) von

rostral nach kaudal angefertigt. Aus diesen Schnitten wurden dann Teile des STR, des motorische und präfrontale CX sowie des Cerebellums mittels einer Stanze (Imtegra Miltex mit Auswurf, 1mm, Sant-Priest, Frankreich) extrahiert. Die entnommenen Gewebestücke wurden direkt in ein im Kryostaten bei -20°C gekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden anschließend bis zur mRNA-Isolation bei -80°C gelagert.

3.3.3.2 mRNA Isolation

Alle Arbeitsflächen und Materialien wurden mit RNase Away (Molekular Bio Products, Toronto, Kanada) eingesprüht, um Kontaminationen mit RNAsen und somit Abbau von RNA zu vermeiden. Die RNA-Isolation aus dem entnommenen Gewebe (s. 3.3.3.1) erfolgte mittels RNeasy Plus Mini Kit. Gemäß des mitgelieferten Versuchsprotokolls (RNeasy Plus Mini Handbook, Stand 2014) wurde die Isolation durchgeführt. Zunächst wurde eine Mischung aus 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und RLT-Puffer (Bestandteil des Kits) mit einer Verdünnung von 1:100 (v/v) hergestellt. 600 µl des Gemischs wurden dann zu den Gewebeteilen dazugegeben und mit einem Handhomogenisator (Pellet Pistill Homogenisiergerät, Scherf Präzision Europa GmbH, Meiningen-Dreissigacker, Deutschland) homogenisiert. Durch das enthaltene Guanidin-Isothiocyanat im RLT-Puffer wird die RNase inaktiviert. Die DNA wurde aus den Gewebeproben entfernt, indem das Homogenat auf die entsprechenden Säulen (gDNA Eliminator Mini-Spin-Columns) aus dem Kit pipettiert und in mitgelieferten Auffanggefäßen bei 10.000 U/min für 45 sec zentrifugiert wurde. Die Säule wurde danach verworfen. Der Durchfluss wurde mit 600 µl 70%igem Ethanol (v/v) versetzt. Dann wurden 600 µl der Flüssigkeit auf RNA-bindende Säulen des Kits (RNeasy Mini Spin Column) pipettiert und in mitgelieferten 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 10.000 U/min 75 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Mit dem Rest der Flüssigkeit wurde der Schritt auf der gleichen Säule wiederholt. Auch dieser Durchfluss wurde verworfen. Zum Reinigen der RNA auf den Spin Columns wurde 700 µl RW1-Puffer (Bestandteil des Kits) auf die Säule pipettiert, bei 10.000 U/min 75 sec zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Das Gleiche erfolgte mit dem 700 µl RPE-Puffer aus dem Kit, wobei 2 min bei 10.000 U/min zentrifugiert wurde. Während die RNA an der Säule gebunden blieb, entfernten die Reinigungspuffer andere Zellbestandteile. Nach Überführen der Säule in ein neues 2 ml mitgeliefertes Auffanggefäß wurde diese für 75 sec bei maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit (14.000 U/min) getrocknet und Flüssigkeitsreste mit

einer Pipette abgesaugt. Im Anschluss wurde zum Herauslösen der RNA die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäße gestellt, 50 µl mitgeliefertes RNase freie Wasser auf die Membran der Säule pipettiert und bei 10.000 U/min 75 sec zentrifugiert. Der Durchfluss erhielt die mRNA, welche laut Hersteller mit mehr als 200 Basenpaaren angereichert ist. Die Lagerung der extrahierten mRNA erfolgte bei -80°C.

3.3.3.3 cDNA Synthese

Zur Umschreibung der mRNA in cDNA sollten die gleichen mRNA-Ausgangskonzentrationen verwendet werden. Unter Verwendung eines Fotometers (Implen Nanometer P 360, München, Deutschland) wurden die mRNA-Gehalte mit dem dazu passenden Deckel (Lid 10, 1 µl/Probe) gemessen. Danach wurde das Verhältnis von RNA-Probe und RNase freiem Wasser so gewählt, dass in 14 µl Gemisch aus RNA-Probe und RNase freiem Wasser ca. 30 ng RNA enthalten sind. Die Umschreibung der mRNA in den komplementären DNA-Strang erfolgte in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen (RNase-, DNase- und Pyrogenfrei). Folgendes Pipettierschema wurde für alle vier Gehirnregionen (motorischer und präfrontaler CX, STR und Cerebellum) verwendet (alles auf Eis pipettiert):

Tabelle 2: Pipettierschema cDNA-Synthese für alle 4 Gehirnregionen. RT: real time,

Reagenzien	Menge je Gehirnregion
Prime Script RT Master Mix	4 µl
RNase freies Wasser	12 µl
mRNA-Probengemisch	4 µl

Der Prime Script Real-Time (RT) Master Mix enthält laut Herstellerangaben folgende Inhaltsstoffe: RNase Inhibitoren, dNTPs (Nukleotide), Magnesiumchlorid, Primer, Reverse Transkriptase und Stabilisatoren. Danach wurde das Gemisch mit einem Tischschüttelgerät (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) vorsichtig geschüttelt (nicht gevortext). Nach kurzem Herunterzentrifugieren der Proben durch eine Tischzentrifuge (Mini-Tischzentrifuge, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde dann die cDNA-Synthese mit einem Thermocycler (Alpha Thermal Cycler, Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland) mit folgendem Programm durchgeführt:

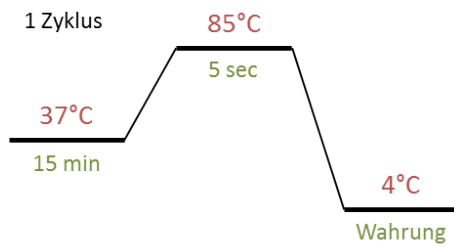


Abbildung 7: Programm Ablauf vom Thermocycler für die cDNA-Synthese.

Um eine ideale Primerhybridisierung und Elongation zu gewährleisten, wurde das Protokoll vom Hersteller beibehalten. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung der cDNA wurde diese mit RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. Der cDNA-Gehalt wurde dann ebenfalls mit dem Nanometer P 360 bestimmt.

3.3.3.4 qPCR

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde ein „Master-Mix“ angefertigt. Dazu wurde das in Tab. 3 aufgelistete Verhältnis verwendet. Da von jeder Master-Mix-Probe Triplets angefertigt wurden, erfolgte die Mischung des Mixes zunächst ohne cDNA-Probe. In einem 200 µl Reaktionsgefäß wurden dann 13,2 µl Mix vorgelegt und je 3,3 µl der entsprechenden cDNA-Probe dazugegeben (alle Angaben beinhalten 10% Sicherheitszuschlag). In eine 96-Well PCR Platte (PiKo PCR Plate, 96-Well, Finnzyme, Espoo, Finnland) wurden drei mal 5 µl Probe pipettiert (Triplet). Pro Gen und Durchgang wurde mindestens eine Negativkontrolle pro Platte mitgeführt (je 5 µl).

Tabelle 3: 5 µl Ansatz für das Reagenzienverhältnis pro Well

Reagenzien	Menge
Prime Ex Taq (Probe qPCR)	2,5 µl
Taq-Man Gene Expression Assay für das entsprechende Gen	0,25 µl
RNase-freies Wasser	1,25 µl
cDNA-Probe	1 µl

Das Prime Ex Tag beinhaltet laut Herstellerangaben folgende Inhaltsstoffe: DNA-Polymerase, dNTPs (Nukleotide), Magnesiumchlorid und Stabilisatoren. Welche Gene zum Einsatz kamen, ist im Punkt 3.2 III angegeben. Im Anschluss wurde die Platte kurz in einer Zentrifuge (Universal 320, Andreas Hettich, Tutlingen, Deutschland) auf max. 1000 U/min anzentrifugiert. Die Amplifikation wurde in einem PikoReal 96 Real-Time

PCR Thermocycler (ThermoScientific, Waltham, USA) durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet:

Tabelle 4: Programm qPCR

Anzahl der Zyklen	Zeit und Temperatur
1	30 sec, 95°C
40	5sec, 95°C
	30 sec, 60°C
1	30 sec, 60°C
1	10 sec, 20°C

Die Polymerase des Kits ist in an einen Antikörper (AK) gekoppelt. Dadurch wird verhindert, dass die PCR vorzeitig gestartet wird. Erst mit einer Temperatur von 95°C wird der AK denaturiert und die Polymerase aktiviert. Bei einer Temperatur von 60°C bindet die cDNA an den Primer und es kommt zur Primerhybridisierung und Elongation des komplementären DNA-Strangs. Im Taq-Man Assay (Expressionsprimer für das entsprechende Gen) sind Fluorophore gebunden, die durch einen Quencher geblockt werden. Beim Binden des Primers an den DNA-Strang und dem darauffolgendem Vervollständigen des Strangs in 5'→3' Schreibrichtung, löst sich der Quencher vom Fluorophor und die Fluoreszenz wird sichtbar. Die Fluoreszenz steigt, je häufiger ein DNA-Strang in 5'→3' Schreibrichtung elongiert wird. Im PikoReal 96 Real-Time PCR Thermocycler wird die Fluoreszenz ständig gemessen und mit Hilfe der PikoReal Software 2.1 (ThermoScientific, Waltham, USA) ausgewertet. Wird ein Schwellenwert (hinterlegt mit 105,49, hinter der Hintergrundfluoreszenz) während eines Zyklus überschritten, wird ein sogenannter ct-Wert (auch als Schwellenwertzyklus oder threshold-cycle bezeichnet) gemessen. Diese ct-Werte dienen zur Quantifizierung der mRNA.

3.4 Statistische Versuchsauswertung

Alle Daten sind mit Sigma Plot Version 12.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) statistisch ausgewertet worden. Ab einem p-Wert von kleiner als 0,05 können statistisch signifikante Unterschiede beschrieben werden, während man bei einem p-Wert von kleiner als 0,1 von einem Trend ausgehen kann.

3.4.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Für die Bildausschnitte der IHC von M1- und M4-Rezeptoren ohne Ko-Markierung wurden die Pixel-Intensitäten bei jedem Foto durch ImageJ wiedergegeben. Aus den Werten der rechten und linken Gehirnhälfte jedes Tieres wurden dann Mittelwerte (MW) für die jeweiligen Gehirnregionen errechnet. Im Anschluss wurden aus diesen Werten die entsprechenden Mittelwerte (MW) für den CX, das STR und dessen vier Subregionen, sowie für das C. callosum ermittelt. Das C. callosum diente als Negativkontrolle. Die MW des C. callosum wurden dann von den MW des CX, des STRs und dessen vier Subregionen abgezogen. Diese Werte dienten als Grundlage für weitere statistische Analysen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test (Normalverteilung, $p > 0,05$), dem Equal Variance Test (Varianzgleichheit, $p > 0,05$), dem t-Test (bei Normalverteilung und Varianzgleichheit, statistischer Unterschied, $p < 0,05$) und der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung mit der Holm-Sidak Methode als post-doc Test (statistischer Unterschied, $p < 0,05$).

Durch ImageJ wurden die Pixel-Intensitäten, die durchschnittliche Größe und ein Farbhistogramm für die rote und grüne Fluoreszenz für jedes ChI der IHC von M4-Rezeptoren mit ChAT wiedergegeben. Daraus wurden MW für die vier STR-Subregionen und ein MW für das gesamte STR errechnet. Diese Werte dienten als Grundlage für weitere statistische Analysen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test (Normalverteilung, $p > 0,05$), dem Equal Variance Test (Varianzgleichheit, $p > 0,05$), dem t-Test (bei Normalverteilung und Varianzgleichheit, statistischer Unterschied, $p < 0,05$), der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung mit der Holm-Sidak Methode als post-doc Test (statistischer Unterschied, $p < 0,05$), Kolmogorov-Smirnov Test (Normalverteilung, $p > 0,2$) und der Pearsonschen Produkt-Moment-Korrelation.

Aus den Bildausschnitten der IHC von M4-Rezeptoren mit Sub P wurden die mittleren Pixel-Intensitäten und ein Farbhistogramm für rote und grüne Fluoreszenz aus 6-7 für Sub P positiven Neuronen von ImageJ wiedergegeben. Daraus wurden MW für die vier STR-Subregionen und ein MW für das gesamte STR errechnet. Diese Werte dienten als Grundlage für weitere statistische Analysen. Die Analyse der Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test (Normalverteilung, $p > 0,05$), dem Equal Variance Test (Varianzgleichheit, $p > 0,05$), dem t-Test (bei Normalverteilung und Varianzgleichheit, statistischer Unterschied, $p < 0,05$) und der zweifaktoriellen

Varianzanalyse mit Messwiederholung mit der Holm-Sidak Methode als post-doc Test (statistischer Unterschied, $p < 0,05$).

3.4.2 qPCR

Aus den ct-Werten wurden zunächst die MW gebildet und die Standardabweichungen (SD) bestimmt. Betrug die SD mehr als 0,25, wurde geprüft, ob dieser Wert offensichtlich von den beiden anderen Werten abweicht. War die SD dann immer noch größer als 0,5, wurde die Probe aus der Wertung genommen. Danach erfolgte eine Berechnung nach der $2^{-\Delta ct}$ -Methode mit anschließender Normalisierung. Die Δct -Werte innerhalb eines Gens wurden wie folgt berechnet:

$$\Delta ct_{\text{Probe}} = MW_{\text{Probe}} - MW_{\text{Probe mit kleinstem MW}}$$

Daraus ergibt sich der $2^{-\Delta ct_{\text{Probe}}}$ -Wert. Diese Berechnung wurde für alle Proben und jeweiligen Gene durchgeführt. Mit Hilfe der GeNorm Software (Stand 2008, Ghent University, Ghent, Belgien) wurden die stabilsten „housekeeping Gene“ ermittelt. Nach den Prinzipien von Vandesompele et al. (2002) wurden dann mittels GeNorm Normalisierungsfaktoren (NF = geometrische Mittel der „housekeeping Gene“) für jede Probe erstellt. Mit Hilfe des NFs und dem $2^{-\Delta ct_{\text{Probe}}}$ -Wert konnte dann die relative Expression (RE) eines Genes pro Probe berechnet werden:

$$RE_{\text{Probe/Gen}} = 2^{-\Delta ct_{\text{Probe}}} / NF_{\text{Probe}}$$

Somit konnten die relative Expression der mRNA innerhalb eines Genes für bestimmte Stichprobengruppen verglichen werden. Statistische Ausreißer wurden mit Hilfe des Grubbs-Test (Graph Pad Software, <https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>, Link aufgerufen am 28.06.2017) identifiziert ($\alpha = 0,05$; Ausreißer $p < 0,05$).

Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test (Normalverteilung, $p > 0,05$), dem Equal Variance Test (Varianzgleichheit, $p > 0,05$) und dem t-Test (bei Normalverteilung und Varianzgleichheit, statistischer Unterschied, $p < 0,05$) analysiert.

4 Ergebnisse

Die M1- und M4-Rezeptoren ohne Doppelfärbung wurden an sechs Kontroll- und DYT1 KI Mäusen (5-6 Monate alt) nach immunhistochemischer Markierung im STR, CX und Corpus callosum (C. callosum) untersucht. Für die IHC der Doppelfärbung des M4-Rezeptors mit ChAT oder Sub P im STR wurden ebenfalls sechs Kontroll- und DYT1 KI Mäusen (5-6 Monate alt) verwendet. Alle IHCs wurden an codierten Objektträgern vorgenommen, damit der Untersucher keine Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der jeweiligen Schnitte hatte. Nach Ermittlung aller Werte wurden die Schnitte entschlüsselt und den jeweiligen Tiergruppen zugeordnet. Des Weiteren wurde an jeweils sechs Kontroll- und DYT1 KI Mäusen (6-7 Monate alt) die M1, M2, M3 und M4 mRNA Expression im STR, Cerebellum, präfrontalen und motorischen CX bestimmt.

4.1 Immunhistochemische Untersuchungen (IHC) am M1- und M4-Rezeptor

4.1.1 IHC von M1-Rezeptoren im Mausgehirn

M1-Rezeptoren befinden sich postsynaptisch auf MSN (Alcantara et al., 2001; Yan et al., 2001). Damit lässt sich eine spezifische Färbung der M1-Rezeptoren in den oben genannten Gehirnregionen darstellen. Da bei der Färbung nicht einzelne Zellen zugeordnet werden konnten, wurde diese mittels Intensitätsmessung der Fluoreszenz (Fotoanalyse) ausgewertet. Nach dem Protokoll von Kapitel 3.3.2.1 wurden Abbildungen von beiden Gehirnhälften des STRs, CX und C. callosums mittels Mikroskop und Kamera erstellt. Es wurden je zwei Schnitte von sechs DYT1 KI Mäusen und sechs Kontrolltieren immunhistologisch markiert. Für die Auswertung wurden beide Gehirnhälften verwendet. Auch die Negativkontrolle wurde unter gleichen Bedingungen behandelt und fotografiert. Während eine starke immunhistochemische Fluoreszenzmarkierung des M1-Rezeptors (Abb. 8) für Wildtyp- und DYT1 KI Mäuse im Bereich des ganzen STRs nachweisbar war, zeigten sich keine fluoreszenzmarkierten M1-Rezeptoren im C. callosum. Im CX ist ebenfalls für beide Genotypen eine Markierung des M1-Rezeptors erkennbar, welche jedoch nicht so ausgeprägt ist wie im STR. Die Negativkontrolle weist keine M1-Rezeptor-Fluoreszenz auf und diente zur Funktionsüberprüfung der IHC.

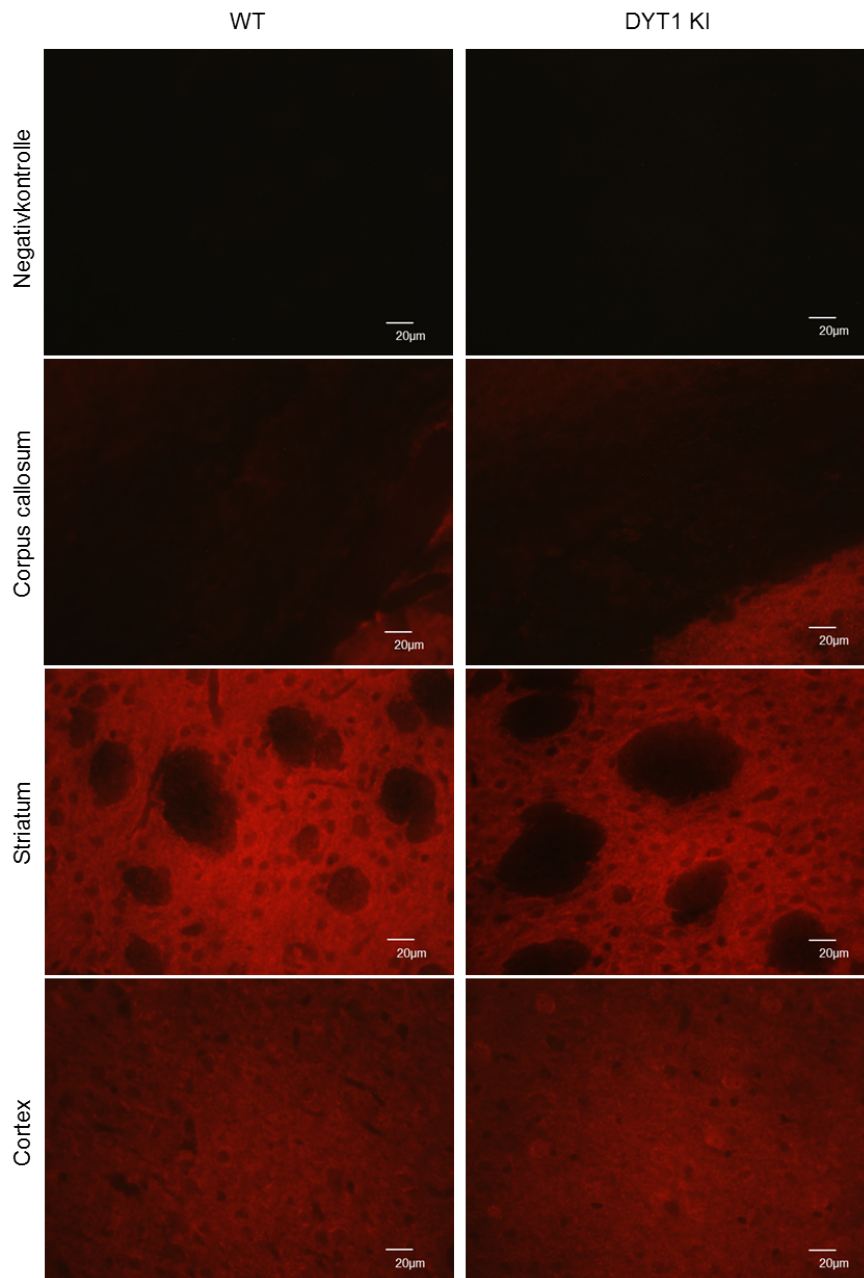


Abbildung 8: Immunhistochemische Markierung von M1-Rezeptoren bei Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe). 40-fache Vergrößerung. WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

Analysiert man die Daten für das STR und dessen vier Subregionen sowie für den CX (Abb. 9), so waren im STR und CX keine signifikanten Genotyp-Effekte für die M1-Rezeptor-Fluoreszenzintensität erkennbar (t-Test, $p > 0,05$). Sowohl im STR als auch im CX waren die Fluoreszenzintensitäten in beiden Genotypen etwa gleich. Im STR lag der MW für die Kontrollgruppe ($n=6$) bei $14,890 \pm 0,669$ und für die DYT1 KI Tiere ($n=6$) bei $16,003 \pm 1,384$ (Abb. 9A). Die MW im CX lagen bei $12,847 \pm 0,093$ für Kontrolltiere ($n=6$) und bei $14,904 \pm 1,010$ für DYT1 KI Tiere ($n=6$) (Abb. 9C). Bei Betrachtung der STR-Subregionen wurde eine statistisch signifikant höhere M1-Rezeptor-

Fluoreszenzintensität von dm, vl und vm zu dl (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=60,266$, $p<0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p<0,05$) und von dm und vm zu vl (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=60,266$, $p<0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p<0,05$) festgestellt (Abb. 9B). Dieser Unterschied war unabhängig von Genotyp. Für die vier STR-Regionen lagen die MW bei $12,442\pm0,786$ (dl, $n=6$), $15,716\pm0,7476$ (dm, $n=6$), $14,699\pm0,7488$ (vl, $n=6$) und $16,705\pm0,6521$ (vm, $n=6$) für Kontrolltiere und bei $13,243\pm1,170$ (dl, $n=6$), $17,517\pm1,556$ (dm, $n=6$), $15,389\pm1,163$ (vl, $n=6$) und $17,862\pm1,708$ (vm, $n=6$) für DYT1 KI Mäuse.

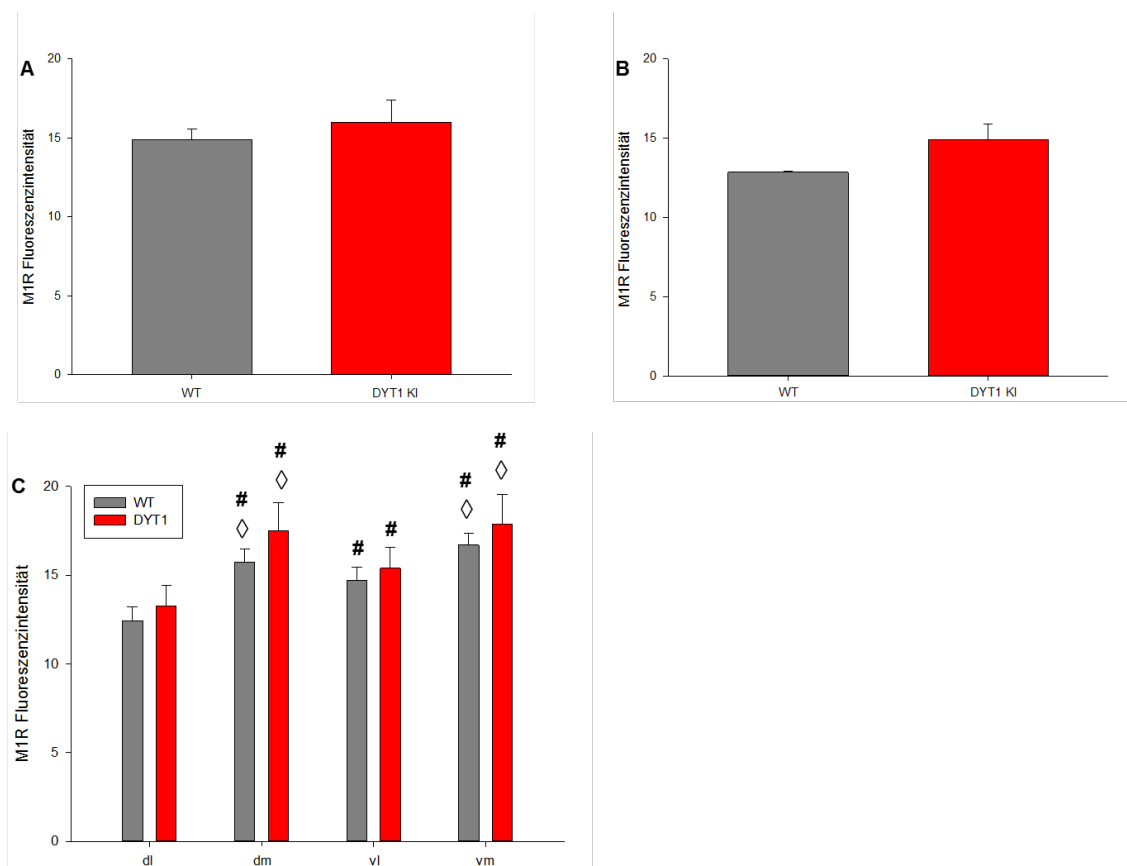


Abbildung 9: Fluoreszenzintensitäten des M1-Rezeptors in Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des M1-Rezeptors im Striatum (A), seinen 4 Subregionen (B) und im Cortex (C). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum nachweisbar. **B** Signifikante Unterschiede der M1-Rezeptorfluoreszenzintensitäten zwischen den Striatum-Subregionen ($\#p<0,05$ vs. dl; $\diamond p<0,05$ vs. vl). **C** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Cortex festgestellt. dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, M1R: M1-Rezeptor, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

4.1.2 IHC von M4-Rezeptoren im Mausgehirn

4.1.2.1 Färbung der M4-Rezeptoren im Gehirn ohne Ko-Markierung

Die Färbung der M4-Rezeptoren ohne Doppelmarkierung im STR, CX und C. callosum ermöglicht einen Überblick über die Expression des M4-Rezeptors auf Proteinebene. Der Färbung konnten nicht einzelne Zellen zugeordnet werden. Somit wurde diese mittels Intensitätsmessung der Fluoreszenz (Fotoanalyse) ausgewertet. Entsprechend der Beschreibung von Kapitel 3.3.2.2 wurden Abbildungen vom STR, CX und C. callosum mittels Mikroskop und Kamera erstellt. Es wurden je zwei Schnitte von sechs DYT1 KI Mäusen und sechs Kontrolltieren immunhistologisch markiert. Es wurden beide Gehirnhälften zur Auswertung hinzugezogen. Auch die Negativkontrolle wurde unter gleichen Bedingungen behandelt und fotografiert. Die immunhistochemische Fluoreszenzmarkierung des M4-Rezeptors (Abb. 10) war im Bereich des ganzen STRs für Kontroll- und DYT1 KI Tiere nachweisbar, wobei nicht ersichtlich war, auf welchen Zellen der M4-Rezeptor vorkommt. Eine geringere, aber dennoch deutliche, Markierung war im CX für beide Genotypen sichtbar. Einzelne stark fluoreszierende Lichtpunkte bzw. -kreise waren erkennbar. Im C. callosum wurde keine Fluoreszenz von M4-Rezeptoren sichtbar. Die Negativkontrolle weist ebenfalls keine Fluoreszenz auf und wurde zur Funktionsüberprüfung der IHC mitgeführt.

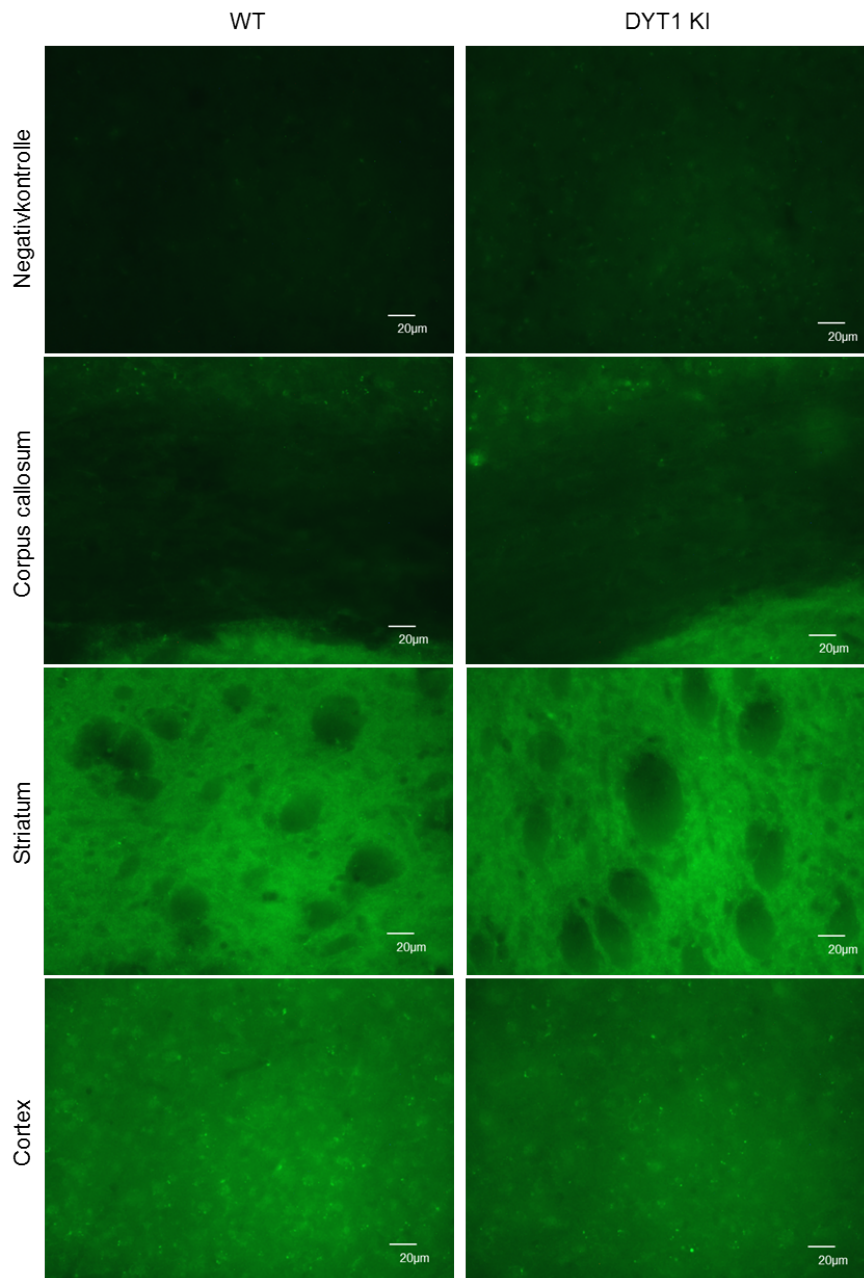


Abbildung 10: Immunhistochemische Markierung von M4-Rezeptoren bei Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe). 40-fache Vergrößerung. WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

In Abb. 11 sind die analysierten Daten für das STR und dessen Subregionen sowie für den CX dargestellt. Im STR und CX gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede im Genotyp (t-Test, $p > 0,05$). Auffällig war, dass die M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität im CX geringer ist als im STR. Der MW im STR für die Kontrollgruppe ($n=6$) lag bei $17,122 \pm 0,657$ und für die DYT1 KI Tieren ($n=6$) bei $15,305 \pm 0,516$ (Abb. 11A). Die MW im CX lagen bei $9,507 \pm 0,537$ für Kontrolltiere ($n=6$) und bei $8,545 \pm 0,371$ für DYT1 KI Tiere ($n=6$) (Abb. 11C). In der Unterteilung des STR in seine Subregionen wurde eine statistische Signifikanz von dl, dm und vl zu vm festgestellt (Zwei-Wege

ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=41,764$, $p<0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode; $p<0,05$) und von dm zu vl (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=41,764$, $p<0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p<0,05$) (Abb. 11B). Diese Unterschiede waren nicht vom Genotyp abhängig. Allerdings konnte auch eine signifikante Verringerung der M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität um ca. 15% bei DYT1 KI Mäusen in den STR-Regionen dl und vl im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=1,275$, $p=0,301$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p<0,05$) (Abb. 11B). Für die einzelnen STR-Regionen lagen die MW bei $18,097\pm0,681$ (dl, $n=6$), $17,213\pm0,586$ (dm, $n=6$), $19,108\pm0,893$ (vl, $n=6$) und $14,070\pm0,826$ (vm, $n=6$) für Kontrolltiere und bei $15,933\pm0,656$ (dl, $n=6$), $15,263\pm0,431$ (dm, $n=6$), $16,820\pm0,818$ (vl, $n=6$) und $13,204\pm0,459$ (vm, $n=6$) für DYT1 KI Mäuse.

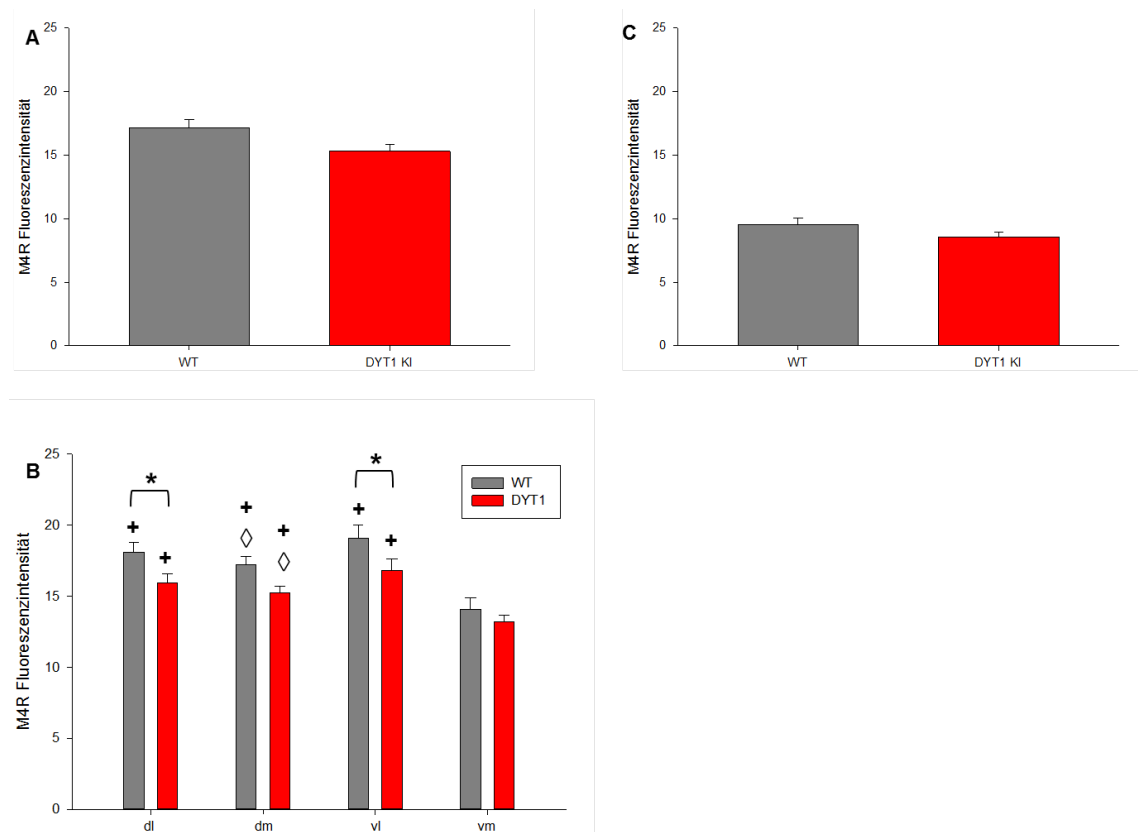


Abbildung 11: Fluoreszenzintensitäten des M4-Rezeptors in Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des M4-Rezeptors im Striatum (A), seinen Subregionen (B) und Cortex (C). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum nachweisbar. **B** Signifikante Unterschiede der M4-Rezeptorfluoreszenzintensität zwischen den Striatumsubregionen ($+p<0,05$ vs. vm; $\diamond p<0,05$ vs. vl) sowie zwischen DYT1 KI und WT im dl und vm Striatum ($*p<0,05$ WT vs. DYT1 KI). **C** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Cortex festgestellt. dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, M4R: M4-Rezeptor, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

4.1.2.2 Expression des M4-Rezeptors in cholinergen Interneuronen

Um zu untersuchen, ob sich Veränderungen von präsynaptischen M4-Rezeptoren auf ChI befinden, wurde eine Doppelfärbung von M4-Rezeptoren und cholinergem Acetyltransferase (ChAT) durchgeführt. Es wurden je zwei Schnitte von sechs DYT1 KI Mäusen und sechs Kontrolltieren immunhistologisch markiert. Eine Negativkontrolle wurde unter gleichen Bedingungen behandelt und markiert, um die Funktionsfähigkeit der IHC zu überprüfen. Die Doppelfärbung wurde exemplarisch mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Bei der Markierung von ChI mittels ChAT handelt es sich um eine zytosolische Färbung, die neben dem Zellkörper auch die Zellausläufer darstellt (Abb. 12 und 13). Bei diesen ChI handelt es sich um polygonale Neurone mit spärlich bedornten Hauptdendriten. Da es sich bei diesen Abbildungen im Konfokalmikroskop lediglich um zweidimensionale Schnitte einer dreidimensionalen Form handelt, sind einzelne Strukturen z.T. nur angeschnitten dargestellt. Aufgrund dessen sind die in der Literatur beschriebenen drei bis sechs Ausläufer der Zelle, die sich meist über mehrere Schnittebenen erstrecken, auf diesen Abbildungen häufig nur teilweise zu erkennen (Abb. 13). In einigen Schnitten, wie auch in Abb. 13 zu sehen, waren die großen Zellkerne der ChI sichtbar, die in Form einer dunklen ovalen Struktur im Zellinneren angeordnet waren. Nur diese ChI mit erkennbarem Zellkern wurden zur Auswertung verwendet.

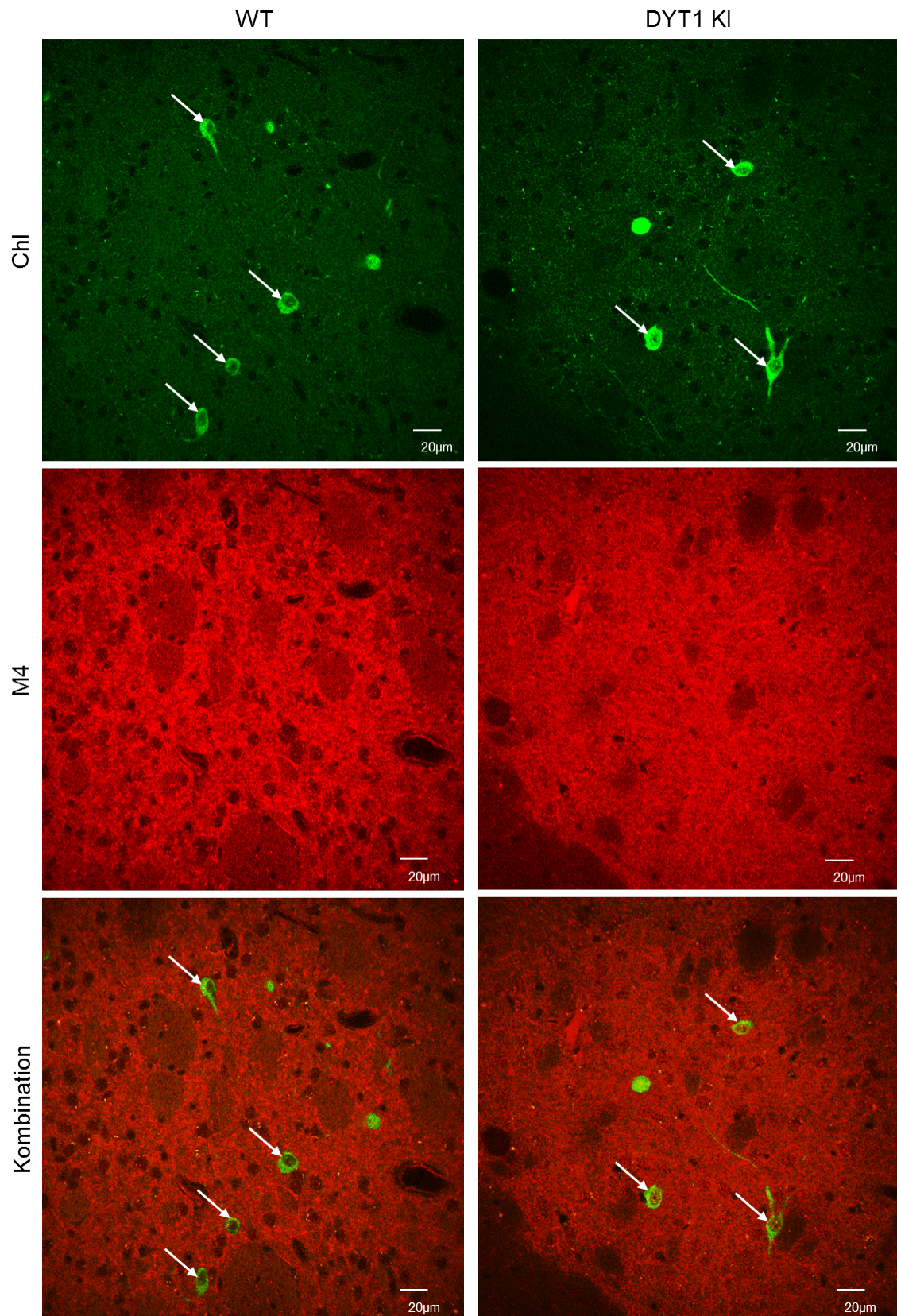


Abbildung 12: Immunhistochemische Markierung von ChI, M4-Rezeptoren und deren Kombination im Striatum von Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe). Markierung der ChI durch weiße Pfeile. Grün: Färbung ChI. Rot: Färbung M4-Rezeptor. 40-fache Vergrößerung. ChI: cholinerge Interneurone, M4: M4-Rezeptoren, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

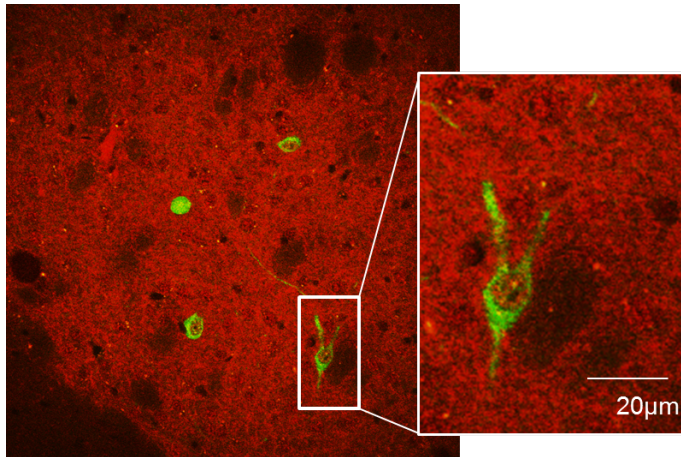


Abbildung 13: Vergrößerte Darstellung eines ChI mit Zellkörper und Zellausläufern.
 Grün: Färbung ChI. Rot: Färbung M4-Rezeptor. 40-fache Vergrößerung. ChI: cholinerge Interneurone

Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Größe (bezogen auf die Bildpixel) von ChI im Gesamtstriatum (t-Test, $p > 0,05$) und den vier STR-Subregionen (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;29)=1,242$, $p > 0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p > 0,05$) waren zwischen DYT1 KI Mäusen und Wildtyptieren nicht nachweisbar (Abb. 14). Die durchschnittliche Größe der ChI im Gesamtstriatum lag bei $6,15 \cdot 10^{-8} \pm 2,51 \cdot 10^{-8} \text{ Pixel}^2$ (Kontrolltiere, $n=6$) und $2,17 \cdot 10^{-7} \pm 8,88 \cdot 10^{-8} \text{ Pixel}^2$ (DYT1 KI Tiere, $n=6$). Für die einzelnen STR-Regionen lagen die MW bei $1,167 \cdot 10^{-6} \pm 4,974 \cdot 10^{-8} \text{ Pixel}^2$ (dl, $n=6$), $1,129 \cdot 10^{-6} \pm 1,691 \cdot 10^{-7} \text{ Pixel}^2$ (dm, $n=6$), $1,496 \cdot 10^{-6} \pm 1,459 \cdot 10^{-7} \text{ Pixel}^2$ (vl, $n=6$) und $1,195 \cdot 10^{-6} \pm 1,572 \cdot 10^{-7} \text{ Pixel}^2$ (vm, $n=6$) für Kontrolltiere und bei $1,165 \cdot 10^{-6} \pm 6,674 \cdot 10^{-8} \text{ Pixel}^2$ (dl, $n=6$), $1,172 \cdot 10^{-6} \pm 6,459 \cdot 10^{-8} \text{ Pixel}^2$ (dm, $n=6$), $1,278 \cdot 10^{-6} \pm 2,178 \cdot 10^{-7} \text{ Pixel}^2$ (vl, $n=6$) und $1,399 \cdot 10^{-6} \pm 1,862 \cdot 10^{-7} \text{ Pixel}^2$ (vm, $n=5$) für DYT1 KI Mäuse.

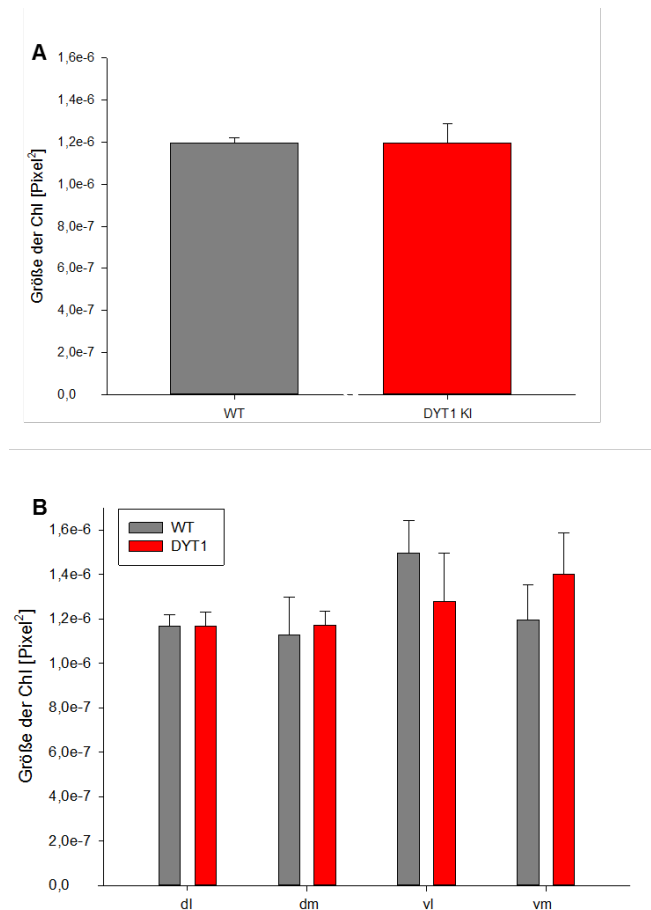


Abbildung 14: Größe striataler ChI von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die durchschnittliche Größe ChI im Striatum (A) und seinen Subregionen (B). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum. **B** Keine signifikanten Unterschiede in den Subregionen des Striatums. dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, ChI: cholinerge Interneurone, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität (Fotoanalyse) von ChAT und M4-Rezeptoren fand anhand einzelner ChI statt. Entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.3.2.2.2 wurden nach Abbilden der vier Subregionen des STRs mit dem Mikroskop und der Kamera die Bildausschnitte bzw. die Neurone ausgewertet. In der Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren ergab sich im Gesamtstriatum kein signifikanter Unterschied zwischen DYT1 KI Mäusen und ihren Wildtypen (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 15A). In den Subregionen konnte eine signifikante Erhöhung in der M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität von dl und dm zu vm unabhängig vom Genotyp nachgewiesen werden (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;26)=4,925$, $p < 0,01$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p < 0,05$) (Abb. 15B). Die MW im Gesamtstriatum lagen für Kontrolltiere ($n=5$) bei $110,12 \pm 10,255$ und für DYT1 KI Tiere ($n=6$) bei $119,843 \pm 10,893$. In den vier STR-Regionen lagen die MW bei $116,627 \pm 9,945$ (dl, $n=5$), $110,050 \pm 10,553$ (dm, $n=5$), $100,928 \pm 13,406$ (vl, $n=5$) und $101,959 \pm 9,528$ (vm, $n=5$) für Kontrolltiere und bei $120,956 \pm 11,982$ (dl, $n=6$), $122,896 \pm 12,275$ (dm, $n=6$), $118,327 \pm 10,451$ (vl, $n=6$) und $112,219 \pm 11,112$ (vm, $n=5$) für DYT1 KI Mäuse.

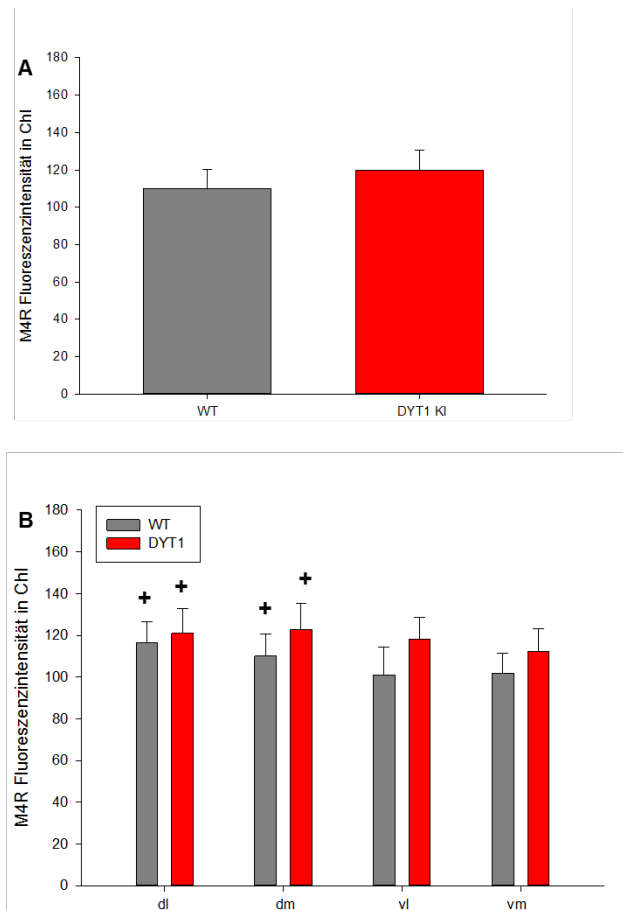


Abbildung 15: Fluoreszenzintensität des M4-Rezeptors in striatalen ChI von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des M4-Rezeptors in ChI im Striatum (A) und seinen Subregionen (B). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum. **B** Signifikante Unterschiede der M4-Rezeptor-fluoreszenzintensität zwischen den Striatumsubregionen ($+p < 0,05$ vs. vm). dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, ChI: cholinerge Interneurone, M4R: M4-Rezeptor, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

Für die Fluoreszenzintensitäten von ChAT ergaben sich weder für das Gesamtstriatum (t-Test, $p > 0,05$) noch für die einzelnen Subregionen (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;26)=1,901$, $p > 0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p > 0,05$) statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 16). Hier lagen die MW für das Gesamtstriatum bei $121,015 \pm 13,699$ (Wildtypiere, $n=5$) und $133,105 \pm 14,405$ (DYT1 KI Tiere, $n=6$). Für die einzelnen STR-Regionen lagen die MW bei $124,152 \pm 14,318$ (dl, $n=5$), $120,065 \pm 19,033$ (dm, $n=5$), $123,299 \pm 18,073$ (vl, $n=5$) und $121,734 \pm 12,995$ (vm, $n=5$) für Kontrolltiere und bei $132,332 \pm 14,997$ (dl, $n=6$), $124,531 \pm 12,886$ (dm, $n=6$), $155,072 \pm 19,118$ (vl, $n=6$) und $124,881 \pm 18,959$ (vm, $n=5$) für DYT1 KI Mäuse.

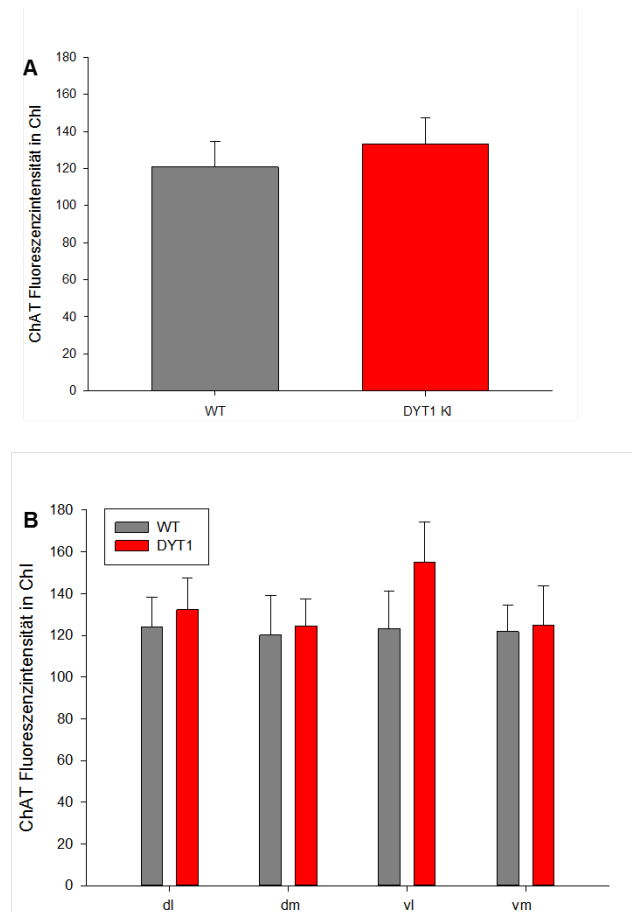


Abbildung 16: Fluoreszenzintensität von ChAT in striatalen ChI von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in ChI im Striatum (A) und seinen Subregionen (B). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum. **B** Keine signifikanten Unterschiede in den 4 Subregionen des Striatums. dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, ChAT: Cholinerge Acetyltransferase, ChI: cholinerge Interneurone, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

Um genauer zu untersuchen, ob es Unterschiede zwischen den beiden Mausgenotypen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität von ChAT bzw. M4-Rezeptoren und der Anzahl der Neurone gibt, wurden Histogramme erstellt (Abb. 17A+B). Dabei wurden einheitliche Bins (hier: Klassen zur Einteilung von Fluoreszenzintensitäten) für beide Fluoreszenzintensitäten gewählt, um diesen die Anzahl der Neurone mit entsprechender Fluoreszenzintensität zu zuordnen. Dies ermöglicht eine Übersicht über die Verteilung und Anzahl der Neurone hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität von ChAT oder M4-Rezeptoren. Sowohl die DYT1 KI Mäuse als auch die Kontrolltiere unterliegen in beiden Histogrammen einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov Test, $p > 0,2$). Im Histogramm der M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität ist erkennbar, dass in Kontrolltieren mehr Neurone bei niedrigeren Fluoreszenzintensitäten vorlagen, während bei DYT1 KI Tieren eher eine Verschiebung in Richtung höherer Fluoreszenzintensitäten sichtbar war. Eine andere Darstellung zur Verteilung der ChI nach ihrer M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität in beiden Genotypen war das Punktedichte-Diagramm (Dot Density, Abb. 18). Diese Abbildung zeigt, dass sich die Anzahl der Neurone in Richtung höherer Fluoreszenzintensitäten bei DYT1 KI Mäusen

verschiebt. Die MW lagen bei $102,133 \pm 3,427$ (Kontrolltiere, $n=88$) und $121,549 \pm 3,119$ (DYT1 KI Tiere, $n=89$).

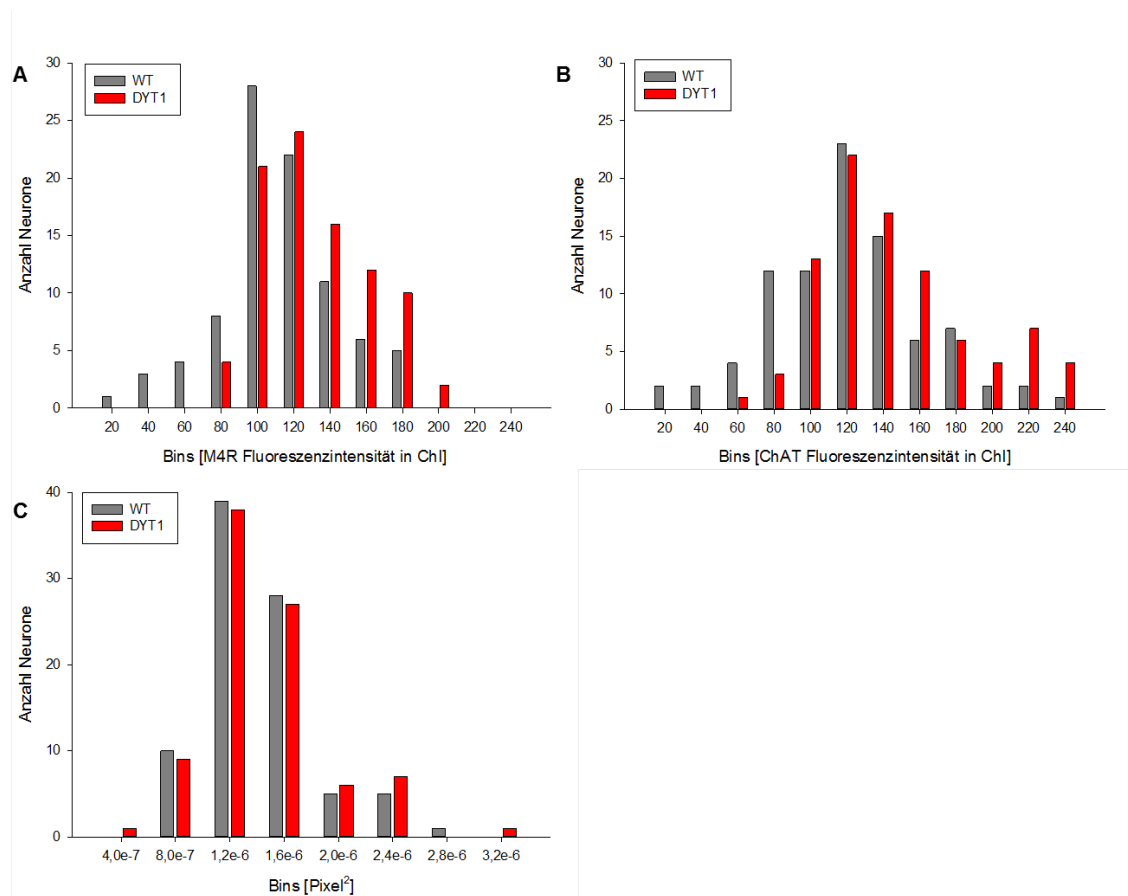


Abbildung 17: Histogramme zur Fluoreszenzintensität und Größe der Neurone bei Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken). Dargestellt sind die Histogramme für die M4-Rezeptor- Fluoreszenzintensität (A), die ChAT- Fluoreszenzintensität (B) und für die Größe der Neurone (C). **A** Normalverteiltes Histogramm für die M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität der M4-Rezeptoren in WT und DYT1 KI ($p>0,2$). **B** Normalverteiltes Histogramm für die ChAT-Fluoreszenzintensität von ChAT in WT und DYT1 KI ($p>0,2$). **C** Normalverteiltes Histogramm für die Größe der ChAT-Neurone in WT und DYT1 KI ($p>0,2$). WT: Wildtyp-/Kontrolltier, ChAT: Cholinerge Acetyltransferase, ChI: Cholinerge Interneurone, M4R: M4-Rezeptor.

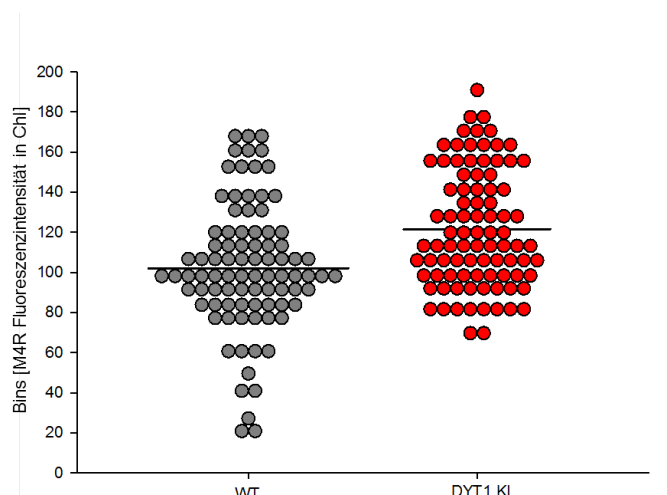


Abbildung 18: Dot Density für Kontrolltiere (graue Punkte) und DYT1 KI Tiere (rote Punkte). Dargestellt ist die Verteilung der Neurone nach ihrer M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität und deren MW (schwarze Linie) in Wildtypen und DYT1 KI Mäusen. WT: Wildtyp-/Kontrolltier

Für die Untersuchung der Größe der Neurone in Kontroll- und DYT1 KI Tieren wurde ebenfalls ein Histogramm angefertigt (Abb. 17C). Dabei stellten die Bins die Klassen für die Einteilung in verschiedene ChI-Größen dar. Auch diese Verteilung ist normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov Test, $p > 0,2$). Da sich laut Abb. 17C die Größe der Neurone in beiden Mausgenotypen nicht unterscheidet, bestätigt sich die quantitative Beurteilung der IHC. In Abb. 19 ist ein Zusammenhang zwischen der Größe der ChI und der Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren für Wildtypen und DYT1 KI Tiere hergestellt worden. Erkennbar ist, dass die Regression zwischen der Größe der Neurone und der Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren in Kontrolltieren (Abb. 19A) nahezu null ist (Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelation, $r = 0,0264$, $p = 0,807$, $n = 88$). Dahingegen ist eine leicht ansteigende Regression zwischen Größe der Neurone und der M4-Rezeptoren-Fluoreszenzintensität in DYT1 KI Mäusen (Abb. 19B) sichtbar (Pearsonsche Produkt-Moment-Korrelation, $r = 0,236$, $p = 0,0262$, $n = 89$).

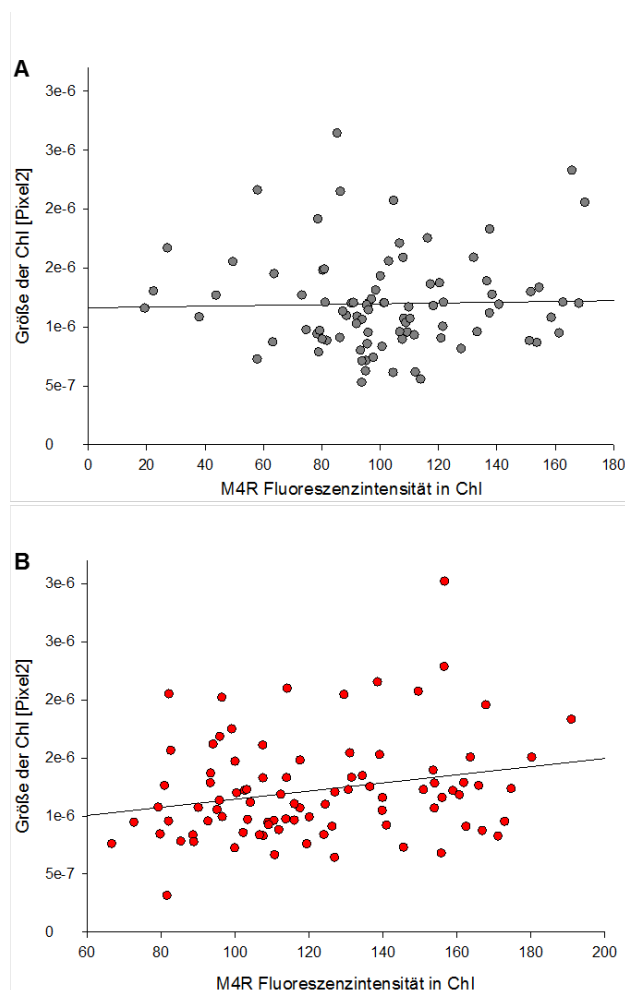


Abbildung 19: Punktdiagramm von Kontrolltieren (graue Punkte) und DYT1 KI Tiere (rote Punkte). A Korrelation zwischen der Größe der ChI und der M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität in Kontrolltieren. B Korrelation zwischen der Größe der ChI und der M4-Rezeptor-Fluoreszenzintensität in DYT1 KI Tieren. Die schwarze Linie stellt die Regression dar. WT: Wildtyp-/Kontrolltier, ChI: Cholinerge Interneurone, M4R: M4-Rezeptor.

4.1.2.3 Expression des M4-Rezeptors auf direkten Projektionsneuronen

Da sich M4-Rezeptoren auch auf postsynaptischen direkten MSNs befinden, wurde eine Doppelfärbung von M4 und Sub P durchgeführt. Dadurch wurde erkennbar, ob die angefärbten M4-Rezeptoren auf den direkten MSN vorkommen. Es wurden je zwei Schnitte von sechs DYT1 KI Mäusen und sechs Kontrolltieren immunhistologisch markiert. Eine Negativkontrolle wurde unter gleichen Bedingungen behandelt und gefärbt, um die Funktionsfähigkeit der IHC zu überprüfen. Dabei wurde kein primärer AK für Sub P mitgeführt. Die Doppelfärbung wurde exemplarisch mit dem Konfokalmikroskop untersucht. Ein grüner Ring um das Neuron ließ auf Sub P positive Neurone schließen (Abb. 20 und 21 weiße, durchgezogene Pfeile). Nur diese wurden zur Auswertung verwendet. Die schwarzen Punkte in den Bildern der IHC der Sub P Färbung und der Färbung der Kombination aus Sub P und M4-Rezeptor sprechen für Neurone, die kein Sub P enthalten (Abb. 20 und 21, weiße, gestrichelte Pfeile).

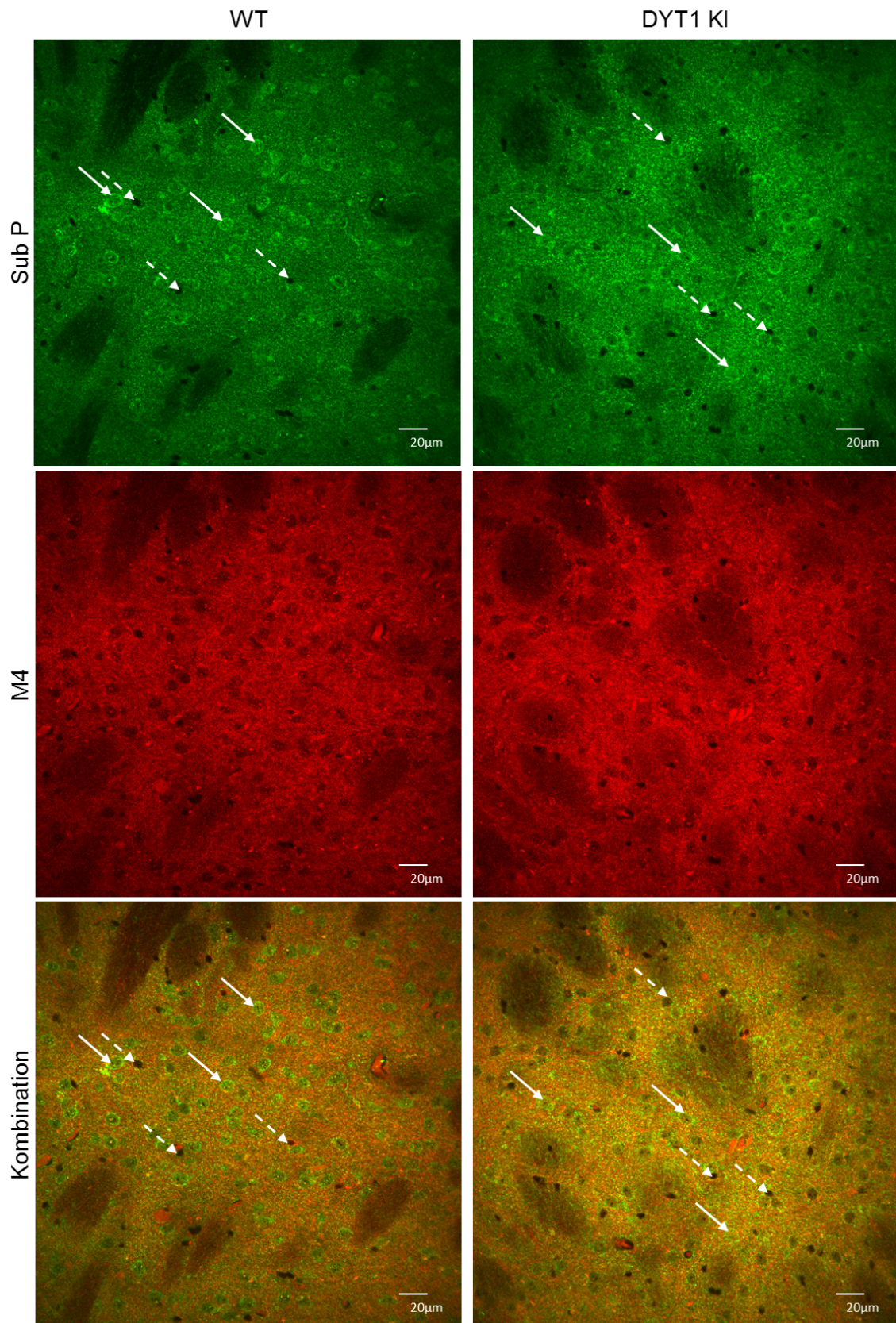


Abbildung 20: Immunhistochemische Markierung von Substanz P, M4-Rezeptoren und deren Kombination im Striatum von Kontrolltieren (linke Bildreihe) und DYT1 KI Tieren (rechte Bildreihe). Markierung der Sub P positiven Neurone durch weiße, durchgezogene Pfeile, der Sub P negativen Neurone durch weiße, gestrichelte Pfeile. Grün: Färbung Sub P. Rot: Färbung M4-Rezeptor.

Gelb: Kombination der Sub P und M4-Rezeptor Färbung 40-fache Vergrößerung. WT: Wildtyp-/Kontrolltier, Sub P: Substanz P, M4: M4-Rezeptor.

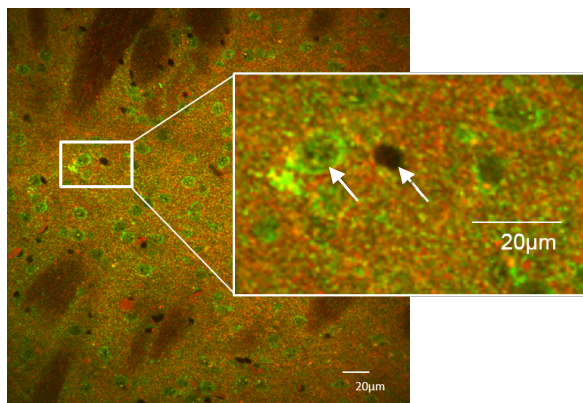


Abbildung 21: Vergrößerte Darstellung von einem Substanz P positiven und negativen Neuron. Markierung des Sub P positiven Neurons durch weißen, durchgezogene Pfeil, des Sub P negativen Neurons durch weißen, gestrichelten Pfeil. Grün: Färbung Sub P. Rot: Färbung M4-Rezeptor. Gelb: Kombination der Sub P und M4-Rezeptor Färbung 40-fache Vergrößerung

Analysiert man die Daten für die Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren in Sub P positiven Neuronen, so ergibt sich kein Genotypeffekt im Gesamtstriatum (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 22A). Die Intensität war bei beiden Genotypen annähernd gleich. Die MW lagen bei $160,151 \pm 16,556$ (Kontrolltiere, $n=6$) und bei $150,422 \pm 15,849$ (DYT1 KI Tiere, $n=6$). Auch in den einzelnen vier STR-Subregionen konnte weder in den Genotypen (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(1;30)=0,180$, $p > 0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p > 0,05$) noch in den Regionen untereinander (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=2,13$, $p > 0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p > 0,05$) ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 22B). Auch hier wichen die Fluoreszenzintensitäten kaum voneinander ab. Die MW in den vier STR-Subregionen lagen bei $154,956 \pm 17,184$ (dl, $n=6$), $156,953 \pm 19,199$ (dm, $n=6$), $166,657 \pm 14,664$ (vl, $n=6$) und $162,039 \pm 17,299$ (vm, $n=6$) für Kontrolltiere und bei $140,654 \pm 17,352$ (dl, $n=6$), $155,717 \pm 14,709$ (dm, $n=6$), $157,071 \pm 17,601$ (vl, $n=6$) und $148,248 \pm 16,858$ (vm, $n=6$) für DYT1 KI Mäuse.

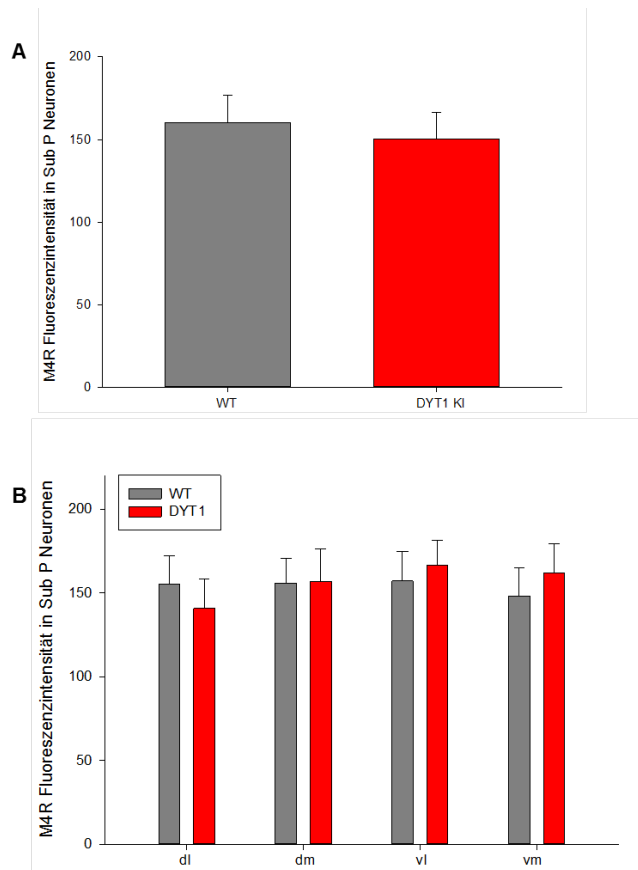


Abbildung 22: Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren in Substanz P positiven Neuronen von Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von M4-Rezeptoren in Sub P positiven Neuronen im Striatum (A) und seinen Subregionen (B). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum. **B** Keine signifikanten Unterschiede in den 4 Subregionen des Striatums. dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, Sub P: Substanz P, M4R: M4-Rezeptor, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

In Abb. 23 sind die Daten für die Fluoreszenzintensität von Sub P wiedergegeben. Hier ergab sich für das Gesamtstriatum kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und DYT1 KI Tieren (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 23A). Der MW für Kontrolltiere ($n=6$) lag bei $159,338 \pm 9,61$ und für DYT1 KI Tieren ($n=6$) bei $126,864 \pm 16,637$. In den STR-Subregionen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität von Sub P von dm und vm zu dl nachgewiesen (Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholung, $F(3;30)=3,548$, $p < 0,05$; Post-hoc Test: Holm-Sidak Methode, $p < 0,05$) (Abb. 23B). Dieser Unterschied war nicht vom Genotyp abhängig. In den einzelnen STR-Regionen lagen die MW bei $147,945 \pm 13,74$ (dl, $n=6$), $165,034 \pm 15,397$ (dm, $n=6$), $161,092 \pm 8,459$ (vl, $n=6$) und $163,222 \pm 6,334$ (vm, $n=6$) für Kontrolltiere und bei $111,354 \pm 17,465$ (dl, $n=6$), $134,368 \pm 15,482$ (dm, $n=6$), $126,682 \pm 19,126$ (vl, $n=6$) und $135,053 \pm 17,996$ (vm, $n=6$) für DYT1 KI Mäuse.

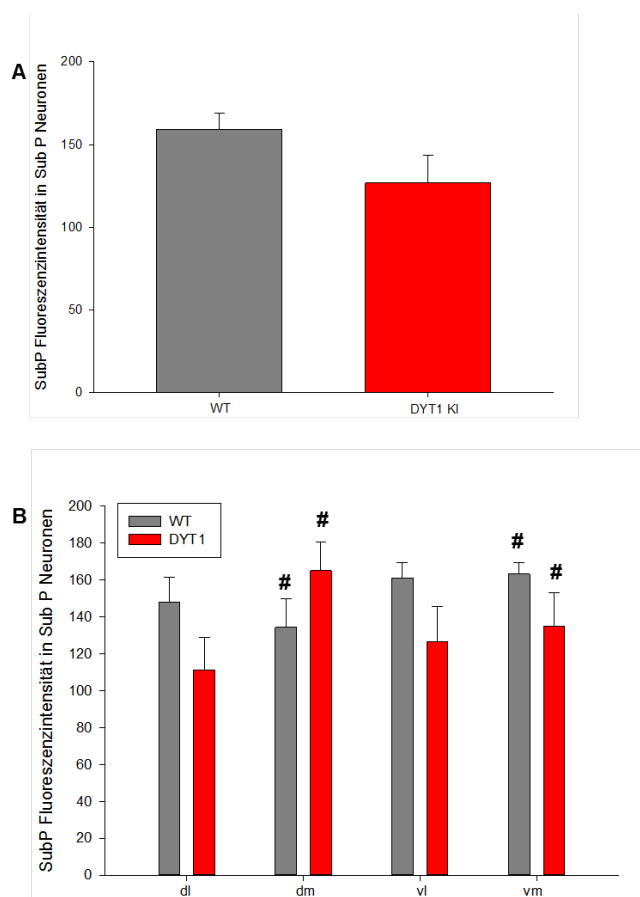


Abbildung 23: Fluoreszenzintensität von Substanz P in Kontrolltieren (graue Balken) und DYT1 KI Tieren (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von Sub P in Sub P positiven Neuronen im Striatum (A) und seinen Subregionen (B). **A** Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen im Gesamtstriatum. **B** Signifikante Unterschiede der Sub P-Fluoreszenzintensität zwischen den Striatum-subregionen ($\#p<0,05$ vs. dl). dl: dorsolateral, dm: dorsomedial, vl: ventrolateral, vm: ventromedial, Sub P: Substanz P, WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

4.2 Ergebnisse zur Untersuchung der mRNA mittels quantitativer PCR (qPCR)

4.2.1 M1 mRNA Gehalte im Mausgehirn

In Abb. 24 sind die Ergebnisse der M1 mRNA Expression in vier Gehirnregionen dargestellt. Ein signifikanter Unterschied ergab sich zwischen DYT1 KI und Kontrollmäusen in der relativen Expression von M1 mRNA im STR (t-Test, $p<0,01$) (Abb. 24A). In DYT1 KI Tieren war die M1 mRNA Expression fast doppelt so hoch wie in Wildtypmäusen. Der MW der Kontrolltiere ($n=6$) lag bei $0,392\pm0,0554$ und der DYT1 KI Tieren ($n=6$) bei $0,666\pm0,0537$. Bei der Bestimmung der M1 mRNA im motorischen CX musste ein Kontrolltier aus der Wertung genommen werden, da die Werte der Triplikate der qPCR zu weit auseinander lagen (Standardabweichung $>0,5$). Es wurde eine statistisch signifikante niedrigere Expression von ca. 25% der M1 mRNA im motorischen CX von DYT1 KI Mäusen nachgewiesen (t-Test, $p<0,05$) (Abb. 24B). Bei Kontrolltieren ($n=5$) lag der MW bei $0,78\pm0,0519$ und bei DYT1 KI Tieren ($n=6$) bei $0,594\pm0,0488$. Im präfrontalen CX und Cerebellum wurden keine statistisch

signifikanten Unterschiede in beiden Genotypen in der M1 mRNA Expression festgestellt (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 24C+D). Die M1-Expression im präfrontalen CX und Cerebellum war bei Kontroll- und DYT1 KI Mäusen nahezu gleich. Im Cerebellum war die M1-Expression im Gegensatz zu allen anderen Gehirnregionen sehr gering. Die MW der Kontrolltiere lagen bei $0,511 \pm 0,112$ im präfrontalem CX ($n=6$) und bei $0,158 \pm 0,073$ im Cerebellum ($n=6$). In DYT1 KI Mäusen lagen die MW bei $0,472 \pm 0,056$ im präfrontalem CX ($n=6$) und bei $0,214 \pm 0,121$ im Cerebellum ($n=6$).

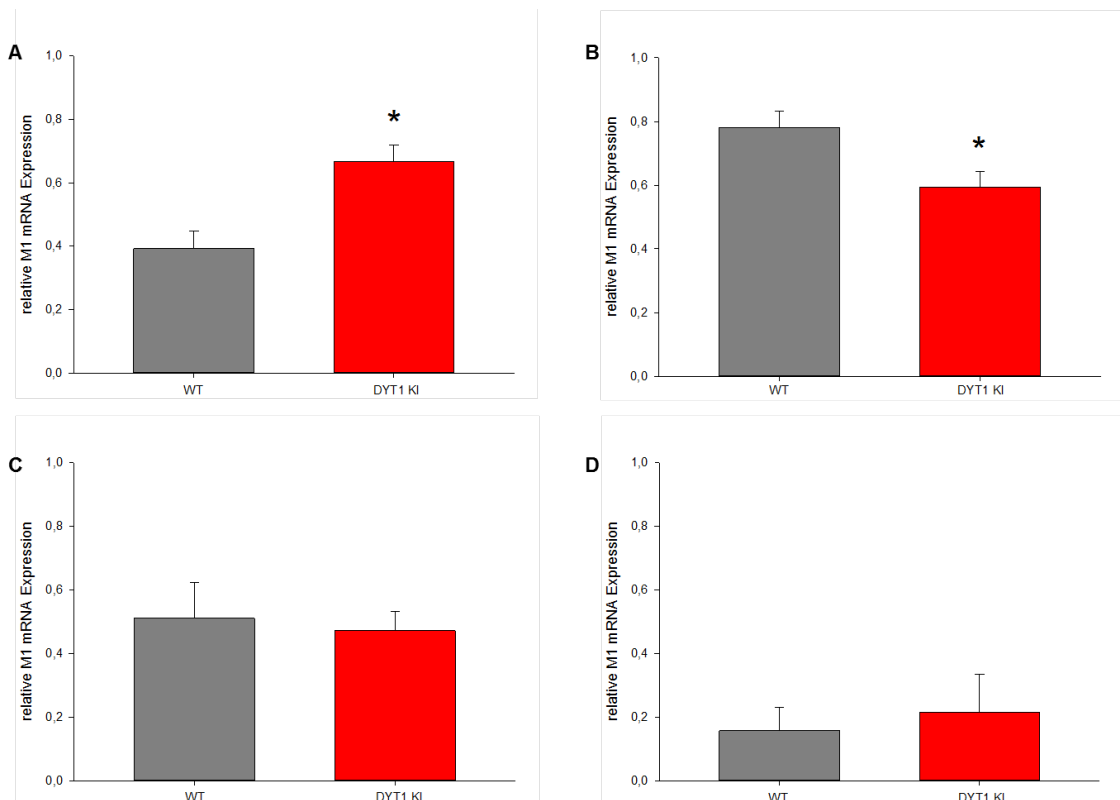


Abbildung 24: Relative mRNA-Expression von M1-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA von M1 zu den „housekeeping Genen“ im Striatum (A), motorischen Cortex (B), präfrontalen Cortex (C) und Cerebellum (D). **A** Es zeigte sich eine höhere M1-Expression in DYT1 KI Tieren im Striatum (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **B** Im motorischen Cortex wurden eine verringerte M1-Expression in DYT1 KI Tieren festgestellt (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **C + D** Im präfrontalem Cortex und Cerebellum zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen in der M1-Expression. WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

4.2.2 M2 mRNA Gehalte im Mausgehirn

Abbildung 25 stellt die mRNA-Expression des M2-Rezeptors im STR, Cerebellum, präfrontalen und motorischen CX dar. Im STR wurde eine signifikante höhere M2-Expression in DYT1 KI Mäusen nachgewiesen (t-Test, $p < 0,01$) (Abb. 25A). Es gab eine Erhöhung in der M2-Expression um mehr als 50% in DYT1 KI Mäusen im Gegensatz

zu Kontrolltieren. Deren MW lagen bei $0,305 \pm 0,046$ in Wildtyp-Tieren ($n=6$) und bei $0,681 \pm 0,086$ in DYT1 KI Tieren ($n=6$). Im motorischen CX hingegen wurde eine signifikante Erniedrigung der M2-Expression in DYT1 KI Mäusen festgestellt (t-Test, $p < 0,05$) (Abb. 25B). Diese lag bei fast 30%. Die MW lagen bei $0,644 \pm 0,062$ in Kontrollmäusen ($n=5$) und bei $0,44 \pm 0,025$ in DYT1 KI Tieren ($n=5$). Es musste ein Kontroll- und ein DYT1 KI Tier aus der Wertung genommen werden, da die Werte der Triplikate der qPCR zu weit auseinander lagen (Standardabweichung $> 0,5$). Im präfrontalen CX und Cerebellum wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen aufgezeigt (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 25C+D). Der MW im präfrontalen CX lag bei $0,446 \pm 0,104$ im Kontrolltier ($n=6$) und bei $0,233 \pm 0,064$ im DYT1 KI Tier ($n=6$). Im Cerebellum lag der MW von Wildtypmäusen ($n=6$) bei $0,172 \pm 0,032$ und von DYT1 KI Mäusen ($n=6$) bei $0,252 \pm 0,112$.

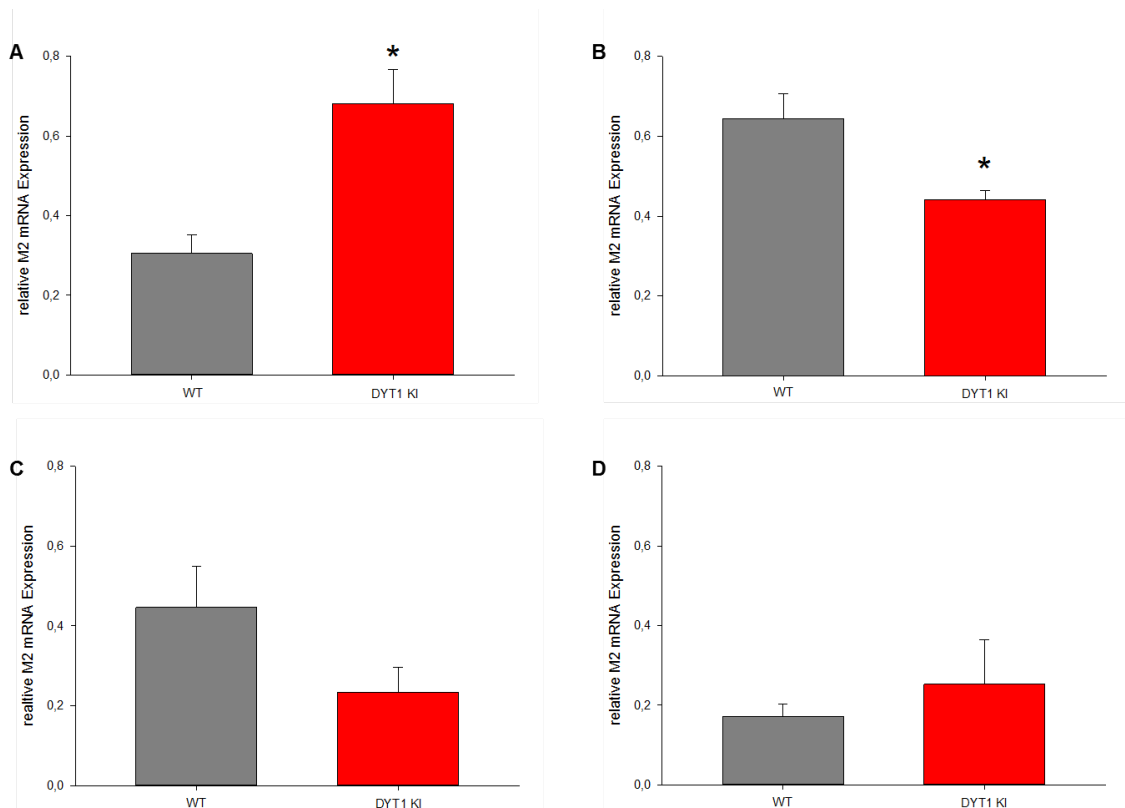


Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von M2-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA von M2 zu den „housekeeping Genen“ im Striatum (A), motorischen Cortex (B), präfrontalen Cortex (C) und Cerebellum (D). **A** Es zeigte sich eine erhöhte M2-Expression in DYT1 KI Tieren im Striatum (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **B** Im motorischen Cortex war die M2-Expression in DYT1 KI Tieren geringer (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **C + D** Im präfrontalen Cortex und Cerebellum wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen in der M2-Expression festgestellt. WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

4.2.3 M3 mRNA Gehalte im Mausgehirn

Die Auswertung der M3 mRNA Expression in vier Gehirnregionen ist in Abb. 26 dargestellt. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen DYT1 KI und Kontrollmäusen in der relativen Expression von M3 mRNA im STR gefunden (t-Test, $p < 0,05$) (Abb. 26A). Die M3-Expression war in DYT1 KI Tieren mehr als doppelt so hoch als in Kontrolltieren. Der MW der Kontrolltiere ($n=6$) lag bei $0,236 \pm 0,042$ und bei DYT1 KI Tieren ($n=6$) bei $0,542 \pm 0,088$. Bei der Bestimmung im motorischen CX musste ein Kontrolltier aus der Wertung genommen werden, da die Werte der Triplikate der qPCR zu weit auseinander lagen (Standardabweichung $> 0,5$). Im motorischen CX wurde eine signifikant niedrigere M3-Expression um ca. 35% bei DYT1 KI Mäusen nachgewiesen (t-Test, $p < 0,05$) (Abb. 26B). Bei Kontrolltieren ($n=5$) lag der MW bei $0,674 \pm 0,053$ und bei DYT1 KI Tieren ($n=6$) bei $0,502 \pm 0,024$. Im präfrontalem CX und Cerebellum wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgenotypen in der M3 mRNA Expression festgestellt (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 26C+D). Die M3-Expression ist im Cerebellum bei beiden Genotypen sehr gering. Es wurden im Cerebellum zwei DYT1 KI Mäuse aus der Wertung genommen, da die Werte der Triplikate der qPCR zu weit auseinander lagen (Standardabweichung $> 0,5$). Die MW der Kontrolltiere lagen bei $0,572 \pm 0,11$ im präfrontalem CX ($n=6$) und bei $0,094 \pm 0,018$ im Cerebellum ($n=6$). In DYT1 KI Mäusen lagen die MW bei $0,38 \pm 0,034$ im präfrontalem CX ($n=6$) und bei $0,221 \pm 0,189$ im Cerebellum ($n=4$).

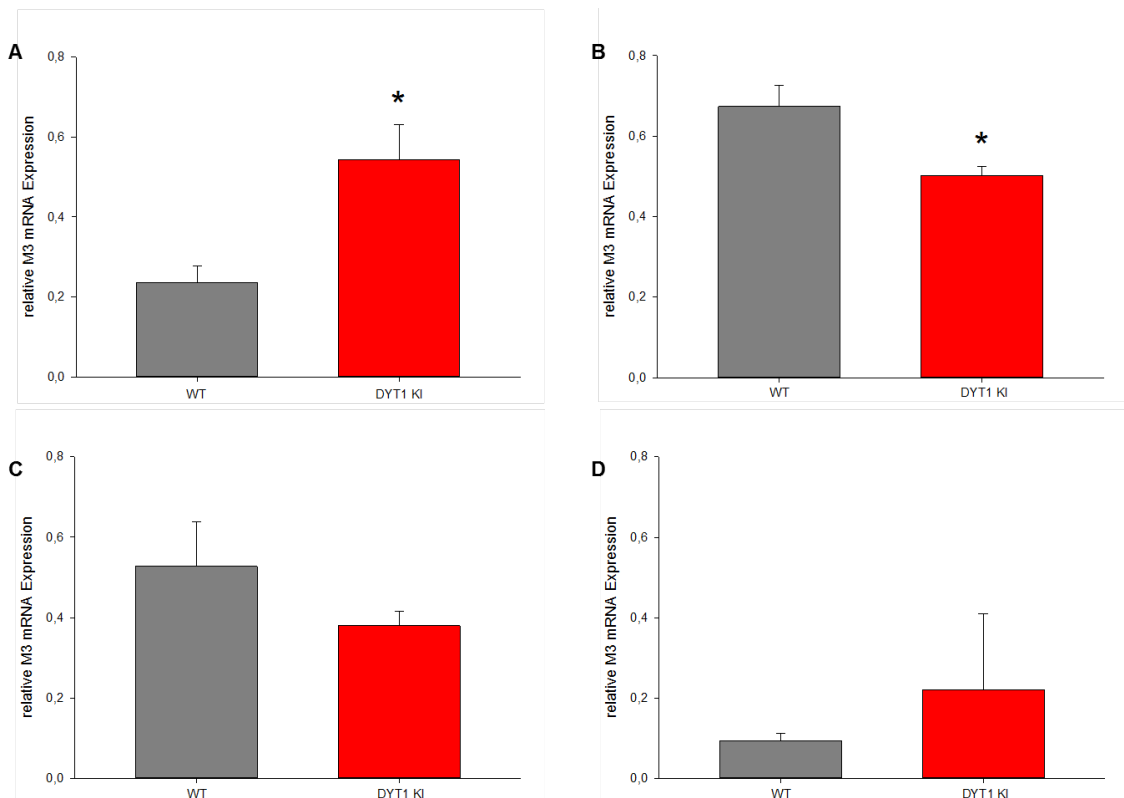


Abbildung 26: Relative mRNA-Expression von M3-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA von M3 zu den „housekeeping Genen“ im Striatum (A), motorischen Cortex (B), präfrontalen Cortex (C) und Cerebellum (D). **A** Es zeigte sich eine erhöhte M3-Expression in DYT1 KI Tieren im Striatum (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **B** Im motorischen Cortex wurde eine geringere M3-Expression in DYT1 KI Tieren gefunden (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **C + D** Im präfrontalen Cortex und Cerebellum wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen in der M3-Expression festgestellt. WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

4.2.4 M4 mRNA Gehalte im Mausgehirn

Bei der Bestimmung der M4 mRNA Gehalte im motorischen CX musste ein Kontrolltier aus der Wertung genommen werden, da die Werte der Triplikate der qPCR zu weit auseinander lagen (Standardabweichung $> 0,5$). Aus dem gleichen Grund wurde im präfrontalen CX ein Kontroll- und ein DYT1 KI Tier aus der Wertung genommen und im Cerebellum ein DYT1 KI Tier.

Die mRNA-Expression des M4-Rezeptors im STR, Cerebellum, präfrontalen und motorischen CX ist in Abb. 27 dargestellt. Im STR wurde keine statistisch signifikante Erhöhung der M4-Expression in DYT1 KI Mäusen nachgewiesen (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 27A). Dennoch ließ sich ein klarer Trend zur Erhöhung erkennen (Equal Variance Test, $p < 0,1$). Deren MW für Kontrollmäuse ($n=6$) lag bei $0,474 \pm 0,088$ und für DYT1 KI Tiere ($n=6$) bei $0,682 \pm 0,065$. Im motorischen CX hingegen wurde eine statistisch signifikant niedrigere M4-Expression in DYT1 KI Mäusen um rund 20% festgestellt (t-

Test, $p < 0,05$) (Abb. 27B). Die MW lagen bei $0,711 \pm 0,039$ in Kontrollmäusen ($n=5$) und bei $0,565 \pm 0,048$ in DYT1 KI Mäusen ($n=6$). Im präfrontalen CX und Cerebellum wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen ermittelt (t-Test, $p > 0,05$) (Abb. 27C+D). In beiden Regionen war die M4-Expression bei Kontroll- und DYT1 KI Mäusen nahezu gleich. Der MW im präfrontalen CX lag bei $0,491 \pm 0,055$ im Kontrolltier ($n=5$) und bei $0,465 \pm 0,036$ im DYT1 KI Tier ($n=5$). Im Cerebellum lag der MW von Wildtypmäusen ($n=6$) bei $0,279 \pm 0,038$ und von DYT1 KI Mäusen ($n=5$) bei $0,325 \pm 0,127$.

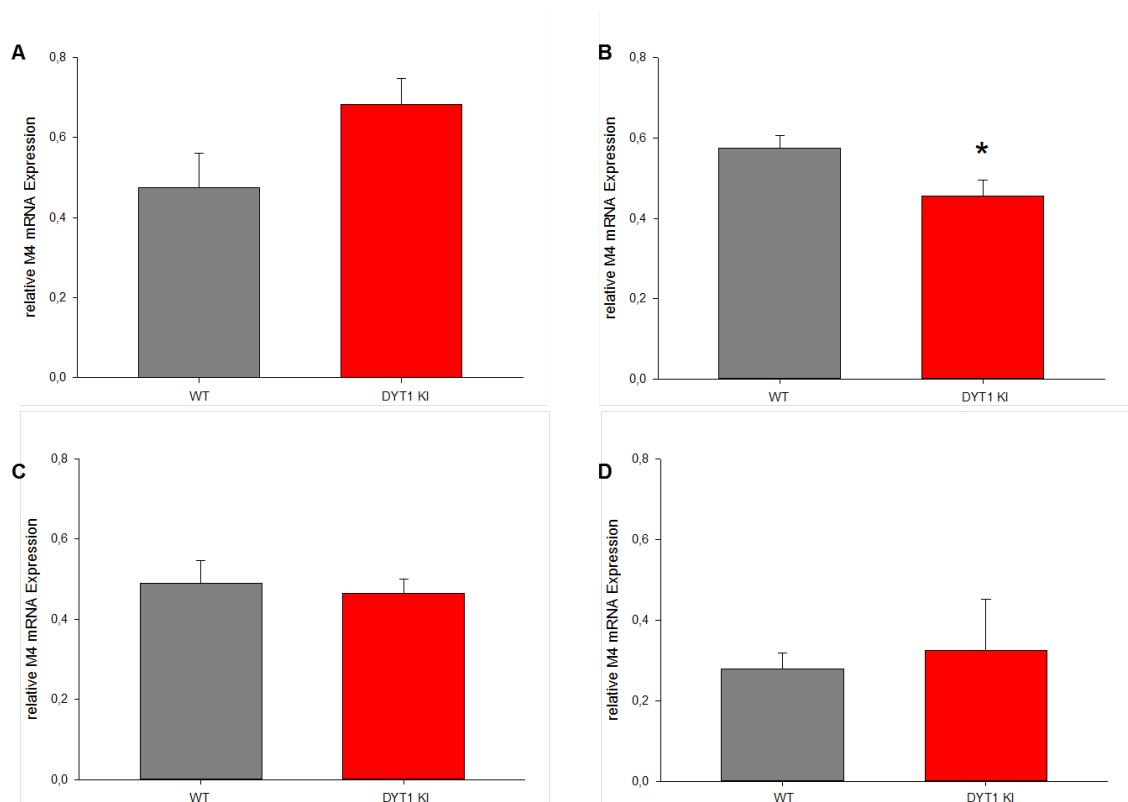


Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von M4-Rezeptoren bei Kontrollmäusen (graue Balken) und DYT1 KI Mäusen (rote Balken). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist die relative Expression der mRNA von M4 zu den „housekeeping Genen“ im Striatum (A), motorischen Cortex (B), präfrontalen Cortex (C) und Cerebellum (D). **A** Im Striatum wurde zwischen beiden Genotypen lediglich eine Tendenz zur höheren M4-Expression bei den DYT1 KI nachgewiesen. **B** Im motorischen Cortex zeigte sich eine verringerte M4-Expression in DYT1 KI Tieren (* $p < 0,05$ WT vs. DYT1 KI). **C + D** Im präfrontalen Cortex und Cerebellum wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen in der M4-Expression festgestellt. WT: Wildtyp-/Kontrolltier.

5 Diskussion

5.1 Ausgewählte Aspekte zur Methodik

5.1.1 Methodische Aspekte zur Genotypisierung

Nach Zucht und Absetzen der Tiere wurden die DYT1 knock-in (KI) Mäuse mittels einer PCR genotypisiert (Methode s. 3.3.1), um sie von ihren Wildtypgeschwistern zu unterscheiden. Die Protokolle zur Genotypisierung wurden durch Tanabe et al. (2012) und im hiesigen Institut etabliert (Gerstenberger, 2017; Richter et al., 2017). Als sehr empfindliches Nachweisverfahren dient die PCR dazu, auch kleinste DNA-Mengen durch Amplifikation nachzuweisen. Da dieses Verfahren anfällig für Kreuzkontaminationen ist, wird stets eine Negativkontrolle mitgeführt. Um eine Aussage über die Expression eines Proteins treffen zu können, sollte auch die Proteinebene untersucht werden. Das Vorliegen eines Gens reicht dazu nicht aus (Schenkel, 2006). Die Expression des Protein TorsinA wurde in früheren Untersuchungen im Westenblot analysiert (Goodchild et al., 2005) und wurde in dieser Arbeit nicht noch einmal untersucht.

5.1.2 Methodische Aspekte zur IHC

Zur Erfassung möglicher Unterschiede im cholinergen System von DYT1 KI Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern wurden immunhistochemische Untersuchungen (IHC) durchgeführt. Es handelt sich um eine seit vielen Jahren etablierte Methode, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern (AK) in Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden können. Damit ist es möglich, Rückschlüsse auf das Vorkommen des Proteins in bestimmten Gehirnregionen zu ziehen. Das Hauptaugenmerk der hier zugrundeliegenden Untersuchungen lag auf der Verteilung der mAChR, insbesondere der Subtypen 1 und 4 (M1, M4), in der DYT1 KI Maus. Zur Markierung der Rezeptorsubtypen dienten AK, die sich in früheren Studien als geeignet erwiesen hatten (Fusco et al., 2003; Pienaar et al., 2015; Saunders et al., 2015; Hamann et al., 2017). Im Gegensatz zu autoradiografischen Analysen, in denen die Dichte von Rezeptoren in Gewebeschnitten analysiert werden kann (Quirion et al., 1987), erlaubt die IHC durch Doppelmarkierungen eine Differenzierung nach Neuronenpopulationen. Aussagen über die Bindungsaffinität unter *in-vivo* Bedingungen sind hierüber jedoch nicht möglich.

In Anlehnung an Hamann et al. (2017) wurde die IHC des M1- und M4-Rezeptors in dieser Arbeit erfolgreich realisiert. Subtyp-spezifische AK für den M1- bzw. M4-Rezeptor wurden ausführlich charakterisiert. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der AK spezifisch für den jeweiligen Subtyp Rezeptor ist und keine Kreuzreaktionen zu erwarten sind (Levey et al., 1991; Hersch et al., 1994; Hamann et al., 2017). Auch das in der vorliegenden Arbeit gefundene Verteilungsmuster der markierten M1- und M4-Rezeptoren entsprach dem vorangegangener Untersuchungen im Mausgehirn. Unspezifische Bindungen konnten durch Negativkontrollen und die fehlenden Markierungen im C. callosum ausgeschlossen werden.

Da M1-Rezeptoren nur postsynaptisch vorkommen (Hersch et al., 1994; Yan et al., 2001) war eine Unterscheidung von prä- und postsynaptischen Neuronen nicht notwendig. M4-Rezeptoren sind hingegen hauptsächlich präsynaptisch auf ChI und postsynaptisch auf striatonigralen MSN und glutamatergen Endigungen lokalisiert (Levey, 1993b; Hersch et al., 1994; Pancani et al., 2014; Eskow Jaunarajs et al., 2015). Neben einer erfolgreichen M4-Einfachmarkierung wurden daher Doppelmarkierungen durchgeführt. Zur Untersuchung der präsynaptischen M4-Rezeptoren auf ChI wurde zusätzlich eine Markierung der Cholinacetyltransferase (ChAT) durchgeführt. ChAT—das Enzym für die Biosynthese von ACh—erreicht einen hohen Gehalt in ChI, während andere Neurone im STR wie die Projektionsneurone kein ChAT exprimieren (Eckenstein and Thoenen, 1982). Es gilt als zuverlässiger Marker für ChI. In früheren Studien wurde Acetylcholinesterase als immunhistochemischer Marker zur Identifizierung von ChI eingesetzt. Da dieses Enzym nicht nur in ChI exprimiert wird, sondern auch in Somatostatin-haltigen IN (Sirviö and Riekkinen, 1992), kommt es heutzutage für diese Fragestellung nicht mehr zum Einsatz. Cholinerge IN wurden in DYT1 KI Mäusen und deren Wildtypgeschwistern gefunden. In den eigenen Untersuchungen stimmten die markierten Zellen in der Verteilung und Morphologie mit früheren Beschreibungen von ChAT⁺-IN bei Nagern überein (Kawaguchi et al., 1997; Hamann et al., 2006).

Die Markierung postsynaptischer M4-Rezeptoren wurde in Anlehnung an Fusco et al. (2003) mit Erfolg durchgeführt. Dabei wurde zur Färbung von striatalen Projektionsneuronen (MSN) Substanz P (Sub P) als Marker verwendet. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung ohne primären AK für Sub P mitgeführt. Nur striatonigrale MSN exprimieren Sub P (Gerfen, 1992) und können daher zur Auswertung von M4-Rezeptoren auf diesen Neuronentypen herangezogen werden.

Dabei wurden sowohl in Wildtypmäusen als auch in DYT1 KI Mäusen striatonigrale MSN nachgewiesen. Wie aus der Literatur zu erwarten war, findet sich Sub P in fast der Hälfte aller MSN wieder (Blomeley and Bracci, 2008).

5.1.3 Methodische Aspekte zur qPCR

Zur relativen Quantifizierung der mRNA spielt die Vergleichsgröße eine besondere Rolle. Dafür wurden die stabil exprimierten Gene (sogenannte „house-keeping genes“) Hprt, Gapdh, Eif4a2 und Atp5b ausgewählt. Die „house-keeping“ Gene Gapdh und Hprt sind in fast allen Zelltypen vertreten und eignen sich daher als Referenzgene für die qPCR (Huggett et al., 2005). In einer Studie von Benn et al. (2008) wurde die Stabilität verschiedener Gene (unter anderem Gapdh, Atp5b und Eif4a2) mit Hilfe der GeNorm Software im CX, STR und Cerebellum untersucht. Die Stabilität der einzelnen Gene unterlag einem Ranking, in dem hauptsächlich Eif4a2 im STR, Atp5b im Cerebellum und Atp5b im CX stabil exprimiert wurden.

In dieser Arbeit erfolgte die Auswertung nach der $2^{-\Delta ct}$ -Methode mit anschließender Normalisierung durch das geometrische Mittel von den vier stabil exprimierten Genen (Vandesompele et al., 2002). Durch die Verwendung mehrerer „Referenzgene“ sind die Ergebnisse weniger von Schwankungen der einzelnen Referenzgene betroffen, was sonst zu Fehlinterpretationen führen kann (Vandesompele et al., 2002). Die Expression eines Genes innerhalb einer Gehirnregion ließ sich somit gut zwischen DYT1 KI Mäusen und Kontrolltieren vergleichen. Eine Ausnahme stellt dabei die Bestimmung der mRNA im Cerebellum dar. Hier wurden für die Auswertung nur zwei stabil exprimierte Gene verwendet: Eif4a2 und Atp5b. Die anderen beiden Referenzgene wurden in dieser Gehirnregion nicht ausreichend stark exprimiert und wurden von der Wertung ausgeschlossen. Dennoch sind zwei stabil exprimierte Gene ausreichend, um eine Interpretation der Ergebnisse vorzunehmen.

Die Primerlängen und -differenz, die Schmelztemperatur, der Gehalt an Guanin und Cytosin sowie die Nukleotidkomposition am 3'-Ende sind für das Primerdesign wichtig (Chuang et al., 2013). Die gemessenen Fluoreszenzkurven und die gemessenen ct-Werte während der qPCR geben Aufschluss darüber, dass die Primer an die cDNA gebunden haben (Navarro et al., 2015). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten TaqMan-Assays für die Untersuchung der Genexpression bei DYT1 KI Mäusen geeignet sind. Die Ausreißer bei Werten für verschiedene Gehirnregionen lassen sich damit erklären, dass die Proben für jedes Tier nicht immer in einem Zug

gemessen wurden, sondern zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Im Cerebellum ist die mRNA-Expression zum Teil so niedrig, dass sich Schwankungen durch die Referenzgenen nicht mehr ausgleichen lassen. Im Cerebellum werden hauptsächlich *Atp5b* und *Eif4a2* exprimiert (Benn et al., 2008). Das erklärt die Instabilität der Referenzgene *Gapdh* und *Hprt*, welche aus der Auswertung rausgenommen wurden. Durch eine punktgenaue Präparation der jeweiligen Gehirnregion können hier Fehlerquellen ausgeschlossen werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Es wird vermutet, dass abnorme Aktivitäten im CX, Cerebellum und Basalganglien verantwortlich sind für die DYT1 Dystonie (Eidelberg et al., 1998; Carbon et al., 2009, Breakefield et al., 2008; Nambu et al., 2011). Das STR bildet die Eingangsstruktur der Basalganglien und ist somit an funktionellen Veränderungen der motorischen Verschaltung im Gehirn beteiligt. Die Interaktionen zwischen den ChI und den MSNs sind weitestgehend untersucht (s. 1.2.2). Obgleich cholinerge Fehlfunktionen im STR bei der DYT1 Dystonie angenommen werden (Eskow Jaunarajs et al., 2015), wurden mACh-Rezeptoren bislang nicht untersucht. Es liegen *ex vivo* Daten bezüglich der paradoxen Erregung von ChI vor (Eskow Jaunarajs et al., 2015) und es ist auch bekannt, dass erhöhte ACh-Spiegel bei Dystonie vorkommen (Scarduzio et al., 2017). Aufgrund der vorherigen Befunde waren Veränderungen in der Expression zu erwarten. Bestätigung fand dies für die M1, M2, M3 und M4 mRNA, während sich auf Proteinebene mittel IHC nur für M4 in Subregionen des STR Veränderungen zeigten. Die Ergebnisse werden nachfolgend für die einzelnen Subtypen diskutiert.

5.2.1 Veränderungen von Gq-gekoppelten Rezeptoren (M1, M3) in DYT1 KI Mäusen

M1- und M3-Rezeptoren aktivieren über Gq die Phospholipase C, die wiederum zu einer IP₃-vermittelten Ca²⁺-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum sowie einer DAG-vermittelten Aktivierung der Proteinkinase C führt (Caulfield, 1993). Innerhalb des STRs werden M1-Rezeptoren hauptsächlich von GABAergen Projektionsneuronen (MSNs) exprimiert, wo sie auf Dendriten und Dornen lokalisiert sind und die motorische Kontrolle und synaptische Plastizität beeinflussen (Hersch et al., 1994; Wess et al., 2007; Bonsi et al., 2008). In vorangegangenen Untersuchungen wurde in 78% der striatalen Neurone eine Expression von M1-Rezeptoren

nachgewiesen (Hersch et al., 1994). Die Aktivierung von M1-Rezeptoren führt zur Depolarisation der GABAergen MSN, indem sie den ausgehenden K^+ -Strom reduzieren und gleichzeitig den eingehenden Ca^{2+} -Strom inhibieren. Darüber hinaus werden glutamaterge Efferenzen aus dem motorischen Cortex (CX) und dem Thalamus (TH) durch M1-Rezeptoren positiv moduliert, was ebenfalls in einer Depolarisation der MSN resultiert (Pisani et al., 2007). Eine konstante Erhöhung der striatalen cholinergen Aktivität induziert eine lang-anhaltende intrinsische Plastizität der MSN der direkten und indirekten Signalwege (Lv et al., 2017). Bei DYT1 KI Mäusen wurden durch elektrophysiologische Studien an Hirnschnittpräparaten Veränderungen der corticostriatalen synaptischen Plastizität nachgewiesen, die sich in einer erhöhten Langzeit-Potenzierung (engl: long-term potential, LTP) äußern (Martella et al. (2009). Maltese et al. (2014) zeigten, dass sich die abnorme LTP *in vitro* durch Antagonisten mit Präferenz zu M1-Rezeptoren normalisieren lässt (Maltese et al., 2014).

In Verbindung mit diesen früheren Untersuchungen sind die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen höheren Werte der striatalen M1 mRNA bei DYT1 KI Mäusen im Vergleich zum Wildtyp als Hinweis auf eine M1-vermittelte abnorme striatale Plastizität zu deuten. Über eine abnorme Aktivierung der Basalganglien-Ausgangsstrukturen und somit der thalamocorticalen Verbindung (vgl. Abb. 2) kann dies Konsequenzen auf den motorischen CX haben, wie die hier nachgewiesene geringere M1 mRNA Expression im motorischen CX zeigt. Andererseits konnten durch IHC keine signifikanten Veränderungen in der Expression des M1-Rezeptors bei DYT1 KI Mäusen ermittelt werden, was auf einer beschränkten Quantifizierung des Proteins beruhen könnte. Hierzu bedarf es daher weiterführender Western Blot Analysen.

Zu bedenken ist, dass die M1 mRNA Veränderungen in nicht-dystonen DYT1 KI Mäusen nachweisbar waren. In einem phänotypischen Modell, der *dt^{SZ}*-Hamstermutante, bei der ausgeprägte dystone Episoden induzierbar sind (Richter and Löscher, 1998), wurde mittels IHC eine erhöhte Expression von M1-Rezeptoren im dorsomedialen STR gemessen (Hamann et al., 2017). Striatale pharmakologische Manipulationen des M1-Rezeptors hatten jedoch keine Effekte auf den Schweregrad der Dystonie (Hamann et al., 2017). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen können die hier gefundenen M1 mRNA Werte im STR und motorischen CX zwar die Annahme einer maladaptiven Plastizität im Basalganglien-Netzwerk (Breakefield et al., 2008; DeSimone et al., 2016) bestätigen, jedoch führen die gemessenen Veränderungen nicht zur dystonen Symptomatik in der DYT1 KI Maus. Die Hypothese einer zentralen Rolle cerebellärer

Dysfunktionen im Dystoniegeschehen (Neychev et al., 2008; Fremont et al., 2017) findet durch die vorliegenden Untersuchungen der M1-Rezeptoren sowie weiterer M-Rezeptor-Subtypen keine Bestätigung.

Nur etwa 5% der gesamten mAChR im STR sind M3-Rezeptoren (Levey et al., 1994). Diese konnten mittels Immunpräzipitation in Ratten hauptsächlich im dl STR nachgewiesen werden. Sie befinden sich auf Dendriten der striatopallidalen MSN (Yan et al., 2001). Im frontalen CX sind nur ca. 7% der mAChR M3-Rezeptoren (Levey et al., 1994). Auch durch Hamada et al. (2010) konnte anhand von Mäusen mittels *in-situ* Hybridisierung verdeutlicht werden, dass mehr M3-Rezeptoren im CX als im STR vorhanden sind. Die Expression von M3-Rezeptoren wurde zuvor nicht in Dystoniemodellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde im STR ein erhöhter und im motorischen CX ein geringerer mRNA-Gehalt an M3 in DYT1 KI Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren gefunden. Ein erhöhtes cholinerges Signal unterliegt einer beeinträchtigten corticostriatalen synaptischen Plastizität. Vergleichbare Veränderungen in der neuronalen Plastizität motorischer Schaltkreise werden bei Dystoniepatienten angenommen (Martella et al., 2009; Martella et al., 2014; Calabresi et al., 2016). Somit können auch M3-Rezeptoren an veränderten corticostriatalen Signalwegen beteiligt sein und Auswirkungen auf die Auslösung von Dystonien haben.

Durch die nachgewiesene erhöhte mRNA Expression im STR von DYT1 KI Mäusen können M3-Rezeptoren an einer verringerten striatalen dopaminergen Freisetzung beteiligt sein (Zhang et al., 2002). Auch eine M3-vermittelte abnorme Plastizität ist denkbar, da der M3- wie der M1-Rezeptor über Gq vermittelt wird und somit die gleiche Signalkaskade auslösen kann. Durch die fehlgesteuerten Funktionen in den Basalganglien kann dies Auswirkungen auf die Funktionsweise des motorischen CX haben, wie die geringeren mRNA-Gehalte in DYT1 KI Tieren zeigen. Es sollte die Verteilung der M3-Rezeptoren auf Neuronen und ihre synaptische Plastizität mit Hilfe weiterer Western Blots und Laser-Mikrodissektionen untersucht werden, um die Funktionsweise des M3-Rezeptors bei DYT1 Dystonien zu beleuchten.

5.2.2 Veränderungen von Gi/o-gekoppelten Rezeptoren (M2, M4) in DYT1 KI Mäusen

Muskarinerge ACh-Rezeptoren des Subtyps 2 und 4 sind in vielen Gehirnregionen lokalisiert. Sie inhibieren über Gi-Proteine die Adenylatcyclase und aktivieren G-Protein gekoppelte K⁺-Kanäle, woraus eine Hyperpolarisation resultiert (Caulfield, 1993). M2-Rezeptoren sind neben den M1-Rezeptoren die meist vorhandenen mAChR

im CX beim Säugetier (Levey et al., 1991), wobei der M2-Rezeptor den prädominanten muscarinergen Autorezeptor im Hippocampus und cerebralen CX repräsentiert (Zhang et al., 2002). Mittels Elektronen- und Lichtmikroskop wurden M2-Rezeptoren auf präsynaptischen Endigungen von corticalen Neuronen in Primaten und Ratten nachgewiesen (Levey, 1996). In Mäusen konnte *in vivo* (Douglas et al., 2001) und *in vitro* (Zhang et al., 2002) festgestellt werden, dass M2-Rezeptoren als corticale Autorezeptoren im CX vorkommen. Sie sind verantwortlich für die Freisetzung von ACh. Da M2-Rezeptoren sowohl prä- als auch postsynaptisch vorkommen (Volpicelli and Levey, 2004), wurden keine Untersuchungen auf Proteinebene unternommen.

Aufgrund des nachgewiesenen geringeren M2 (und M4) mRNA Gehalt im CX von DYT1 KI Tieren könnte eine gestörte ACh-Freisetzung vorliegen, was durch weiterführende neurochemische Untersuchungen überprüft werden sollte. Dies könnte einen gestörten striato-corticalen Signalweg zur Folge haben. Laut Alcantara et al. (2001) kommen M2-Rezeptoren im STR vor allem auf ChI vor. Mittels Elektronenmikroskopie konnten sie nachweisen, dass die Rezeptoren auf Axonen symmetrischer Synapsen vorkommen. Auch auf Dendriten von cholinergen Neuronen sind M2-Rezeptoren lokalisiert. An Ratten wurde anhand von *in situ* Hybridisierung und Rezeptorautoradiografie eine hohe Expression an M2-Rezeptoren bzw. -mRNA im dl STR gefunden (Vilaró et al., 1992). Auch der nachweisbar höhere Gehalt an M2 mRNA im STR von DYT1 KI Mäusen bestätigt diese Untersuchungen.

Zusätzlich fand man heraus, dass M2-Rezeptoren auch mit M4-Rezeptoren interagieren. Sie fungieren als Hetero- oder Autorezeptoren (Hersch et al., 1994; Bernard et al., 1998), wobei der M2-Rezeptor nicht auf MSN vorhanden ist (Hersch et al., 1994; Bernard et al., 1998; Alcantara et al., 2001; Threlfell and Cragg, 2011). Da M2-Rezeptoren hauptsächlich extrasynaptisch vorhanden sind, geht man davon aus, dass sie an einer „übergreifenden“ Neurotransmission beteiligt sind (Eskow Jaunarajs et al., 2015). M2-Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle in der Selbstregulierung der ACh-Freisetzung von ChI und inhibieren präsynaptisch die Glutamat-Freisetzung von corticostriatalen Neuronen (Ding et al., 2006; Pakhotin and Bracci, 2007; Higley et al., 2009; Ding et al., 2010). Cholinerge Interneurone sind autonome Schrittmacher und ihre Feuerung unterliegt der inhibitorischen Kontrolle von muscarinergen M2/M4 Autorezeptoren als auch D2-Rezeptoren (Calabresi et al., 1998; Pisani et al., 2000; Bonsi et al., 2008). In Mäusen mit DYT1 Mutation von Sharma et al. (2005) (hemizygot für humanes mutiertes torsinA) ist eine M2/M4-Antwort erhalten, während die D2-

Rezeptor-vermittelte Inhibition in verschiedenen Entwicklungsstadien zur Erregung verschoben ist (Sciamanna et al., 2011). Auf ChI können M2-Rezeptoren mit D2-Rezeptoren durch die Regulation der konvergierenden N-Typ Ca^{2+} -Ionenkanäle interagieren und damit Auswirkungen auf die weitere Signalkaskade auslösen. Scarduzio et al. (2017) zeigten, dass die *in vivo* erhöhten extrazellulären ACh Spiegel im STR der DYT1 KI Maus über vermehrte M2/M4 Aktivierung zur paradoxen D2-Rezeptor vermittelten Erregung der ChI führen kann. So fanden sie in Untersuchungen an Hirnschnitten, dass diese paradoxe D2-Rezeptor-vermittelte Erregung durch den (nicht-selektiven) M2/M4 Antagonisten Oxotremorin unterdrückt wurde. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene höhere M2-Rezeptor mRNA Expression bei DYT1 KI Mäusen im STR unterstützt die Hypothese, dass die M2/M4-vermittelte Autoinhibition gestört ist. Daher sind weiterführende Untersuchungen mittels Western Blot sinnvoll.

Im STR finden sich präsynaptische M4-Rezeptoren auf Endigungen von ChI (Markierung mit ChAT), wo sie als Autorezeptoren mit dem M2-Rezeptor (Kreitzer, 2009) die ACh-Freisetzung inhibieren. Postsynaptisch sind M4-Rezeptoren neben dem D1-Rezeptor auf direkten MSN (Markierung mit Substanz P) zu finden, wo deren Aktivierung unter anderem zu einer Inhibition der Ca_v1 -Kanäle führt und die Feuerung von MSNs beeinflusst (Santiago and Potter, 2001; Pisani et al., 2007). Mittels *in-situ* Hybridisierung konnten M4-Rezeptoren in großer Anzahl im STR nachgewiesen werden (Weiner et al., 1990; Bernard et al., 1992), was mit den IHC-Daten der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Bei Betrachtung der einzelnen STR-Subregionen konnten mehr M4-Rezeptoren im dorsolateralen (dl) und dorsomedialen (dm) STR nachgewiesen werden als im ventromedialen (vm) STR. Eine Erklärung hierfür ist, dass im dorsalen STR mehr ChI vorkommen als im ventralen STR (Kreitzer, 2009).

Auf mRNA-Ebene war ein klarer Trend zur erhöhten M4 mRNA-Expression im Gesamtstriatum von DYT1 KI Mäusen sichtbar, während im CX ein verringerter M4 mRNA-Gehalt nachweisbar war. Die immunhistochemische Analyse des M4-Rezeptors ohne Doppelfärbungen ergab jedoch keinen Unterschied im Gesamtstriatum oder CX zwischen DYT1 KI Tieren und Wildtyp. Tatsächlich beweist die Anwesenheit der mRNA nicht, dass diese in funktionelle Proteine der Zellen translatiert werden können (Sugaya et al., 1997). Mittels IHC, die eine differenzierte Auswertung von Subregionen ermöglichte, zeigte sich im dl und vl STR eine verminderte M4-Rezeptor Expression bei DYT1 KI Mäusen. Eine verminderte Expression präsynaptischer M4-Rezeptoren

könnte eine Disinhibition dopaminerger Neurone bedingen und somit Auswirkungen auf die striatale synaptische Plastizität haben, wie bei DYT1 KI Mäusen nachgewiesen (Calabresi et al., 2000; Wilson, 2005). Daher sollten diese IHC Daten mittels Western Blot verifiziert werden.

Zur Identifizierung von prä- und postsynaptischen M4-Rezeptoren wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistochemische Doppelmarkierungen vorgenommen. Auf ChI kommen präsynaptische M4-Rezeptoren vor (Ding et al., 2006; Bonsi et al., 2008), zu deren Identifizierung eine Ko-Markierung mit ChAT durchgeführt wurde. Es gab keine Unterschiede zwischen den beiden Mausgenotypen. Ergänzend zu den Untersuchungen der Expression von M4-Rezeptoren auf striatalen ChI wurde die Größe der einzelnen ChI von DYT1 KI Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern analysiert, da Song et al. (2013) größere ChI im STR beschrieben hatten (keine Subregion-spezifische Auswertung) und dies als Indiz auf eine erhöhte cholinerge Aktivität ansahen. Die Auswertung ergab, dass sich die Größen zwischen beiden Genotypen nicht signifikant voneinander unterschieden. Dennoch war eine Tendenz zu größeren ChI in DYT1 KI Tieren sichtbar. Unterschiede in den STR-Subregionen konnten nicht ausgewertet werden, da die Anzahl der Neurone zum Vergleich zu gering war. Daher beziehen sich die Erkenntnisse lediglich auf das Gesamtstriatum. Song et al. (2013) wiesen keinen Unterschied in der Anzahl der ChI zwischen den Genotypen auf. Auch das Alter oder das Geschlecht hatten keinen Einfluss auf die Anzahl der ChI. Lediglich das Volumen der Soma der Neurone war in drei und sechs Monate alten DYT1 KI Mäusen vergrößert.

Man geht davon aus, dass M4-Rezeptoren nur auf MSNs des direkten Weges existieren (Gerfen, 1992; Wang et al., 2012) und nicht wie M1-Rezeptoren sowohl striato-pallidal als auch -nigral zu finden sind (Ince et al., 1997; Yan et al., 2001). Um M4-Rezeptoren auf postsynaptischen direkten Projektionsneuronen (MSN) anzufärben, wurde eine Ko-Markierung mit Sub P durchgeführt. Auf Proteinebene konnten hiermit keine Unterschiede in der Expression des M4-Rezeptors auf postsynaptischen MSN zwischen DYT1 KI Mäusen und ihren Wildtypgeschwistern festgestellt werden.

5.3 Schlussbetrachtungen

Zahlreiche *ex vivo* Befunde in Tiermodellen lassen vermuten, dass Fehlfunktionen im striatalen cholinergen System an der Pathogenese der DYT1 Dystonie beteiligt sind (Bonsi et al., 2011). Eine anerkannte Hypothese ist, dass eine veränderte neuronale Plastizität eine Bedeutung für die DYT1 Dystonie hat (Ozelius et al., 2011), wie in verschiedenen DYT1 Mausmodellen nachgewiesen (Martella et al., 2009; Sciamanna et al., 2011; Sciamanna et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob eine veränderte mAChR Expression daran beteiligt sein könnte.

Das vermehrte Vorliegen der mAChR der Subtypen 1-4 im STR und die verringerte Expression im CX in DYT1 KI Mäusen auf mRNA Ebene deutet darauf hin, dass diese an den oben genannten Fehlfunktionen beteiligt sind. Andererseits bestätigten sich diese Befunde nicht auf Proteinebene mittels IHC. Auch zeigte sich bei den DYT1 KI Mäusen kein signifikanter Unterschied in der Größe der ChI zum Wildtyp. Durch eine beschränkte Quantifizierung der Proteine in der IHC können Unterschiede zur qPCR auftreten. Martella et al. (2009) zeigte in den hier verwendeten Mäusen, dass ein erhöhter cholinergischer Tonus im STR verantwortlich sein kann für die veränderte cortico-striatale Plastizität. Die Veränderungen konnten in M2/M4 (-/-) knock-out Mäusen der gleichen Studie bestätigt werden, in dem ein erhöhter ACh-Spiegel nachgewiesen wurde. So könnten die Unterschiede der qPCR-Daten zu den IHC-Daten erklärt werden, da veränderte ACh-Konzentrationen nicht in der IHC sichtbar sind. Um solche Veränderungen zu erklären, bedarf es einer genaueren Untersuchung via Western Blot. Damit lassen sich Proteine detektieren und quantifizieren. Zusätzlich können Proteingehalte verglichen werden und Aussagen zur Größe des Proteins getroffen werden (Towbin et al., 1979; Dennis-Sykes et al., 1985).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gabe des ACh-Agonisten Pilocarpin keine Dystonie in transgenen DYT1 Mäusen auslöste (Kuschka, 2009). Auch systemische Applikationen von Antagonisten mit Präferenzen zu M1- bzw. M4-Rezeptoren zeigten bei diesen DYT1 Mäusen keine Effekte. Im phänotypischen *dt^{sz}*-Hamstermodell konnten eine erhöhte M1-Dichte im dorsomedialen Striatum mittels IHC und leichte antidystone Effekte durch die kombinierte Behandlung mit M1- und M4-Antagonisten nachgewiesen werden (Kuschka, 2009; Hamann et al., 2017). Dies spricht zwar für eine Beteiligung der mAChR in der Pathophysiologie der Dystonie, dystone Symptome werden aber vermutlich nicht allein durch eine cholinerge Hyperaktivität ausgelöst (Hamann et al., 2017). Die höheren mRNA-Gehalte in DYT1

KI Mäusen im Gegensatz zu ihren Wildtypgeschwistern könnten ein Indiz für eine cholinerge Hyperaktivität darstellen. Dies muss jedoch mit anderen Verfahren überprüft werden. So wurde auch mit akuten optogenetischen Stimulationen von ChI im STR von DYT1 KI Mäusen keine Dystonie ausgelöst (Baldeweg, 2018)(Baldeweg, 2018)(Baldeweg, 2018)(Baldeweg, 2018). Andererseits zeigten sich hierüber genotypische Veränderungen in der lokomotorischen Aktivität und in der Dauer der Aktivierung von ChI bei der DYT1 KI Maus (Baldeweg, 2018).

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen erhöhten mRNA Gehalte von M1-M4 unterstützen zwar die Hypothese, dass cholinerge Fehlfunktionen an der veränderten Plastizität bei der DYT1 Dystonie beteiligt sind. Ob diese eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie und der Manifestation der DYT1 Dystonie spielen, bleibt jedoch fraglich. Neben oben genannten ergänzenden Untersuchungen zur Verifizierung der Ergebnisse sollten optogenetische Verfahren wie Optodialyse hierzu weitere Einblicke liefern. Mit solchen Techniken lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Veränderungen der ACh-Spiegel und den Auswirkungen auf zentrale Schaltkreise im Gehirn herstellen.

6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

Bedeutung von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren in der Pathophysiologie der DYT1 Dystonie: Untersuchungen zur Expression im DYT1 knock-in Mausmodell

eingereicht von Dipl. Pharm. Laura Klein

angefertigt an der Universität Leipzig in der Medizinischen Fakultät und

Veterinärmedizinischen Fakultät

betreut von Frau Prof. Dr. Angelika Richter und Herrn Prof. Dr. Achim Aigner

Juli 2018

Dystonie ist eine Bewegungsstörung, die durch ungewollte, anhaltende oder intermittierende Muskelkontraktionen mit abnormalen Haltungen oder Bewegungsabläufen gekennzeichnet ist. Die DYT1 Dystonie stellt die häufigste genetische Form beim Menschen dar. Sie zeigt eine Penetranz von nur 30-40%. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung ist weitgehend ungeklärt und bislang sind wenige Therapieoptionen verfügbar. Den Basalganglien wird eine besondere Rolle in der Entwicklung der Dystonie zugesprochen. Im Striatum (STR), der Eingangsstruktur der Basalganglien, wurden durch *ex vivo* elektrophysiologische Studien Veränderungen in der cholinergen Transmission in verschiedenen Tiermodellen für die DYT1 Dystonie gefunden.

Um der Bedeutung des cholinergen Systems bei der DYT1 Dystonie weiter nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expression der mAChR-Subtypen 1-4 (M1-4) bei DYT1 KI Mäusen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Wie verschiedene transgene Mauslinien zeigt die DYT1 KI Maus keine Dystonie-Symptomatik. Dennoch eignet sie sich aufgrund der hohen „construct validity“ (gleiche Pathophysiologie wie beim Menschen) für pathophysiologische Untersuchungen.

Mittels qPCR war bei den DYT KI Mäusen für M1, M2, M3 sowie tendentiell auch für M4 eine höhere mRNA-Expression im STR sowie für alle Rezeptorsubtypen (M1-4) eine geringere Expression im motorischen Cortex (CX) als beim Wildtyp nachweisbar. Im präfrontalen CX und Cerebellum lagen hingegen keine Unterschiede vor. Auf Proteinebene konnten mittels immunhistochemischer (IHC) Markierungen die mRNA Veränderungen zu M1 Rezeptoren im STR und CX nicht bestätigt werden. Im Gesamtstriatum und CX zeigten sich mittels IHC auch keine Unterschiede in der Fluoreszenzaktivität zwischen den Tiergruppen, die auf Veränderungen der Dichte von M4 Rezeptoren schließen lassen. In Subregionen des STR (dorsolateral und ventrolateral) war die M4-Rezeptorfluoreszenz jedoch in DYT1 KI Mäusen geringer als in Wildtypmäusen. Um zu untersuchen, ob sich die Veränderung in ChI (präsynaptisch) oder striatalen Projektionsneuronen (postsynaptisch) bestätigen, wurden Doppelmarkierungen vorgenommen. Hiermit zeigten sich weder in den ChI noch in den Projektionsneuronen subregionale Veränderungen der M4 Rezeptoren zwischen beiden Genotypen. Ergänzende Untersuchungen ergaben keine Unterschiede in der Größe der ChI, die in einer früheren Studie in DYT1 KI Mäusen beschrieben wurden.

Insgesamt bestätigten zwar die Ergebnisse zur mRNA-Expression der M1-4 Rezeptoren die Hypothese, dass cholinerge Fehlfunktionen an einer maladaptiven Plastizität bei der DYT1 Dystonie beteiligt sein könnten, durch IHC Analysen wurden hingegen keine Veränderungen gefunden. So bedarf es weiterführender Untersuchungen mittels Western blot sowie Studien zur Funktion von cholinergen Rezeptoren im DYT1 KI Mausmodell.

7 Summary

Dissertation to obtain the academic degree

Dr. rer. med

Role of muscarinergic acetylcholine receptors in the pathophysiology of DYT1 dystonia: Investigations of the expression in the DYT1 knock-in mouse model

submitted by Dipl. Pharm. Laura Klein

done at the University of Leipzig at the Medical Faculty and Veterinary Faculty

supervised by Ms. Prof. Dr. Angelika Richter and Mr. Prof. Dr. Achim Aigner

July 2018

Dystonia is a movement disorder, characterized by involuntary sustained or intermittent muscle contractions, leading to abnormal postures or movements. DYT1 dystonia, as the most frequent genetic type of human dystonia, shows a penetrance of only 30-40% . The pathophysiology of DYT1 dystonia remains unclear, limiting treatment options. Basal ganglia dysfunctions seem to play a critical role in the development of dystonia. *Ex vivo* electrophysiological studies in several animal models of DYT1 dystonia indicated altered cholinergic transmission in the striatum (STR), the input structure of the basal ganglia.

We studied expression patterns of specific subtypes of receptors in DYT1-KI mice in order to gain further insight on the role of mAChR subtypes 1-4 and their influence on successional structures in dystonic striatal signaling. Investigations both on protein and mRNA level in several types of neurons uncovered distinct distribution patterns of the four mAChR subtypes with conclusions towards connection patterns between the different elements of the signaling cascade. While various mouse models of DYT1 dystonia do not show dystonic symptoms (Sharma et al., 2005; Shashidharan et al., 2005; Grundmann et al., 2007), high construct validity (resemble pathophysiology like

in people) of the model permits its use for the investigation of pathophysiological changes in patients with DYT1 dystonia.

On mRNA level, all four subtypes of mACh receptors were shown to be overrepresented in the striatum of DYT1KI-mice while a lack of those receptors could be found in the motor cortex. No differences in representation could be shown in prefrontal cortex and cerebellum. For further investigations on protein level, the striatum was partitioned in dorsolateral, ventrolateral, dorsomedial and ventromedial quadrants (dl,vl,dm,vm). Ventrolateral as well as dorso- and ventromedial quadrants in DYT1-KI-mice presented with more M1-receptors when compared to the dorsolateral quadrant. Contrarily, M4 receptors could be found more in the dorso- and ventrolateral as well as the dorsomedial quadrants in unspecific staining with the lateral compartments showing lack of fluorescence in KI-mice. When regarding only presynaptic cholinergic interneurons, only the dorsal quadrants display enhanced fluorescence. No differences in the size of cholinergic interneurons were found and postsynaptic medium spiny neurons did not present with variations in fluorescence between the genotypes. Disparity between results on mRNA- and protein levels can be explained with staining of various proteins as well as unspecific staining which does not allow conclusions towards location of the stained target.

With regard to the existing theory of malfunctioning corticostriatal function as one of the basic pathophysiological pattern in DYT1 dystonia, the specific role of mACh receptors in the signaling cascade of the basal ganglia remains unclear. Despite the detection of changes in mRNA expression giving way to assumption of a putative influence of mAChR on corticostriatal pathway signaling, those assumptions could not be verified on the protein level in immunohistochemical staining. Thorough representation of all four mAChR subtypes throughout the investigated structures is however factual thus their function in modulating pathways and their putative influence on the abnormal signaling patterns in DYT1 dystonia remains subject to further investigation.

8 Literaturverzeichnis

- Albanese A (2011) Terminology for preparations of botulinum neurotoxins: What a difference a name makes. *JAMA* 305:89-90.
- Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VSC, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK (2013) Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28:863-873.
- Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological reviews* 89:73-120.
- Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS (2001) Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: Anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *The Journal of Comparative Neurology* 434:445-460.
- Augood S, Hollingsworth Z, Albers D, Yang L, Leung J, Breakefield X, Standaert D (2004) Dopamine transmission in DYT1 dystonia. *Adv Neurol* 94:53-60.
- Augood S, Hollingsworth Z, Albers D, Yang L, Leung J, Muller B, Klein C, Breakefield X, Standaert D (2002) Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology* 59:445-448.
- Augood SJ, Martin DM, Ozelius LJ, Breakefield XO, Penney JB, Jr., Standaert DG (1999a) Distribution of the mRNAs encoding torsinA and torsinB in the normal adult human brain. *Ann Neurol* 46:761-769.
- Augood SJ, Martin DM, Ozelius LJ, Breakefield XO, Penney JBJ, Standaert DG (1999b) Distribution of the mRNAs encoding torsinA and torsinB in the normal adult human brain. *Ann Neurol* 46:761-769.
- Baldeweg AA (2018) Etablierung der In-vivo-Optogenetik für pathophysiologische Untersuchungen cholinergischer Interneurone in einem Knock-in-Mausmodell für die DYT1 Dystonie. In: Veterinärmedizinische Fakultät. Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie.: Universität Leipzig.
- Baldwin J (1994) Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 6:180-190.
- Bankhead P (2014) Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ: Queen's University Belfast pdf-Dokument. In.
- Benn CL, Fox H, Bates GP (2008) Optimisation of region-specific reference gene selection and relative gene expression analysis methods for pre-clinical trials of Huntington's disease. *Molecular Neurodegeneration* 3:17-17.
- Bernard V, Normand E, Bloch B (1992) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *The Journal of Neuroscience* 12:3591.
- Bernard V, Laribi O, Levey AI, Bloch B (1998) Subcellular Redistribution of m2 Muscarinic Acetylcholine Receptors in Striatal Interneurons &In Vivo& after Acute Cholinergic Stimulation. *The Journal of Neuroscience* 18:10207.

- Blomeley C, Bracci E (2008) Substance P depolarizes striatal projection neurons and facilitates their glutamatergic inputs. *The Journal of Physiology* 586:2143-2155.
- Bolam JP, Wainer BH, Smith AD (1984) Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12:711-718.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy* 196:527-542.
- Bonsi P, Martella G, Cuomo D, Platania P, Sciamanna G, Bernardi G, Wess J, Pisani A (2008) Loss of Muscarinic Autoreceptor Function Impairs Long-Term Depression But Not Long-Term Potentiation in the Striatum. *The Journal of Neuroscience* 28:6258-6263.
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Madeo G, Schirinzi T, Puglisi F, Ponterio G, Pisani A (2011) Centrality of Striatal Cholinergic Transmission in Basal Ganglia Function. *Frontiers in Neuroanatomy* 5:6.
- Breakefield XO, Blood AJ, Li Y, Hallett M, Hanson PI, Standaert DG (2008) The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci* 9:222-234.
- Bressman S, de Leon D, Brin M, Risch N, Burke R, Greene P, Shale H, Fahn S (1989) Idiopathic dystonia among Ashkenazi Jews: evidence for autosomal dominant inheritance. *Ann Neurol* 26:612-620.
- Bressman S, de Leon D, Kramer P, Ozelius L, Brin M, Greene P, Fahn S, Breakefield X, Risch N (1994) Dystonia in Ashkenazi Jews: clinical characterization of a founder mutation. *Ann Neurol* 36:771-777.
- Bressmann S (2006) Genetics of dystonia. *J Neural Transm Suppl*:489-495.
- Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J (2003) Use of M1–M5 Muscarinic Receptor Knockout Mice as Novel Tools to Delineate the Physiological Roles of the Muscarinic Cholinergic System. *Neurochemical Research* 28:437-442.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends in Neurosciences* 23:120-126.
- Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Sancesario G, Alan North R, Bernardi G (1998) Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurons. *The Journal of Physiology* 510:421-427.
- Calabresi P, Pisani A, Rothwell J, Ghiglieri V, Obeso JA, Picconi B (2016) Hyperkinetic disorders and loss of synaptic downscaling. *Nat Neurosci* 19:868-875.
- Carbon M, Niethammer M, Peng S, Raymond D, Dhawan V, Chaly T, Ma Y, Bressman S, Eidelberg D (2009) Abnormal striatal and thalamic dopamine neurotransmission: Genotype-related features of dystonia. *Neurology* 72:2097-2103.
- Casey D, Gerlach J, Christensson E (1980) Dopamine, acetylcholine, and GABA effects in acute dystonia in primates. *Psychopharmacology* 70:83-87.
- Caulfield MP (1993) Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics* 58:319-379.
- Caulfield MP, Birdsall NJM (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews* 50:279.
- Chang HT, Kita H (1992) Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons. *Brain Research* 574:307-311.

- Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters* 35:1541-1549.
- Dang MT, Yokoi F, McNaught KSP, Jengelley T-A, Jackson T, Li J, Li Y (2005) Generation and characterization of Dyt1 \square GAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia. *Experimental Neurology* 196:452-463.
- Dang MT, Yokoi F, Cheetham CC, Lu J, Vo V, Lovinger DM, Li Y (2012) An anticholinergic reverses motor control and corticostriatal LTD deficits in Dyt1 \square GAG knock-in mice. *Behavioural brain research* 226:465-472.
- Dani JA, Bertrand D (2007) Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47:699-729.
- DeAndrade MP, Trongnetrpunya A, Yokoi F, Cheetham CC, Peng N, Wyss JM, Ding M, Li Y (2016) Electromyographic evidence in support of a knock-in mouse model of DYT1 Dystonia. *Movement Disorders*:n/a-n/a.
- Deffains M, Bergman H (2015) Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Movement Disorders* 30:1014-1025.
- DeLong MR, Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of Neurology* 64:20-24.
- Dennis-Sykes C, Miller W, McAleer W (1985) A quantitative Western Blot method for protein measurement. *J Biol Stand* 13:309-314.
- DeSimone JC, Febo M, Shukla P, Ofori E, Colon-Perez LM, Li Y, Vaillancourt DE (2016) In vivo imaging reveals impaired connectivity across cortical and subcortical networks in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiology of Disease* 95:35-45.
- Dimova R, Vuillet J, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L (1993) Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience* 53:1059-1071.
- Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, Levitt P, Wilson CJ, Hamm HE, Surmeier DJ (2006) RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9:832-842.
- Ding JB, Guzman JN, Peterson JD, Goldberg JA, Surmeier DJ (2010) Thalamic Gating of Corticostriatal Signaling by Cholinergic Interneurons. *Neuron* 67:294-307.
- Doig NM, Magill PJ, Apicella P, Bolam JP, Sharott A (2014) Cortical and Thalamic Excitation Mediate the Multiphasic Responses of Striatal Cholinergic Interneurons to Motivationally Salient Stimuli. *The Journal of Neuroscience* 34:3101-3117.
- Douglas CL, Baghdoyan HA, Lydic R (2001) M2 Muscarinic Autoreceptors Modulate Acetylcholine Release in Prefrontal Cortex of C57BL/6J Mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299:960.
- Eckenstein F, Thoenen H (1982) Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons. *The EMBO Journal* 1:363-368.
- Eglen RM, Choppin A, Watson N (2001) Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends in Pharmacological Sciences* 22:409-414.

- Eidelberg D, Moeller J, Antonini A, Kazumata K, Nakamura T, Dhawan V, Spetsieris P, deLeon D, Bressman S, Fahn S (1998) Functional brain networks in DYT1 dystonia. *Annals of Neurology* 44:303-312.
- Eskow Jaunarajs KL, Bonsi P, Chesselet MF, Standaert DG, Pisani A (2015) Striatal cholinergic dysfunction as a unifying theme in the pathophysiology of dystonia. *Progress in Neurobiology* 127–128:91-107.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) CENTRAL CHOLINERGIC SYSTEMS AND COGNITION. *Annual Review of Psychology* 48:649-684.
- Fahn S, Bressman S, Marsden C (1998) Classification of dystonia. *Adv Neurol* 78:1-10.
- Felder C, Bymaster F, Ward J, DeLapp N (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *Journal of medicinal chemistry* 43:4333-4353.
- Fiorio M, Gambarin M, Valente EM, Liberini P, Loi M, Cossu G, Moretto G, Bhatia KP, Defazio G, Aglioti SM, Fiaschi A, Tinazzi M (2007) Defective temporal processing of sensory stimuli in DYT1 mutation carriers: a new endophenotype of dystonia? *Brain* 130:134-142.
- Foster DJ, Gentry PR, Lizardi-Ortiz JE, Bridges TM, Wood MR, Niswender CM, Sulzer D, Lindsley CW, Xiang Z, Conn PJ (2014) M(5) Receptor Activation Produces Opposing Physiological Outcomes in Dopamine Neurons Depending on the Receptor's Location. *The Journal of Neuroscience* 34:3253-3262.
- Fremont R, Tewari A, Angueyra C, Khodakhah K (2017) A role for cerebellum in the hereditary dystonia DYT1. *eLife* 6:e22775.
- Fusco FR, Martorana A, De March Z, Viscomi MT, Sancesario G, Bernardi G (2003) Huntingtin distribution among striatal output neurons of normal rat brain. *Neuroscience Letters* 339:53-56.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends in Neurosciences* 15:133-139.
- Gerstenberger J (2017) Sensomotorische Phänotypisierung von Mausmodellen für zentralnervöse Bewegungsstörungen. In: *Veterinärmedizinische Fakultät. Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie.*: Universität Leipzig.
- Giles LM, Chen J, Li L, Chin L-S (2008) Dystonia-associated mutations cause premature degradation of torsinA protein and cell-type-specific mislocalization to the nuclear envelope. *Human Molecular Genetics* 17:2712-2722.
- Gonzalez-Alegre P, Paulson HL (2004) Aberrant Cellular Behavior of Mutant TorsinA Implicates Nuclear Envelope Dysfunction in DYT1 Dystonia. *The Journal of Neuroscience* 24:2593-2601.
- Goodchild RE, Dauer WT (2004) Mislocalization to the nuclear envelope: An effect of the dystonia-causing torsinA mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:847-852.
- Goodchild RE, Dauer WT (2005) The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *The Journal of Cell Biology* 168:855-862.
- Goodchild RE, Kim CE, Dauer WT (2005) Loss of the Dystonia-Associated Protein TorsinA Selectively Disrupts the Neuronal Nuclear Envelope. *Neuron* 48:923-932.

- Granata A, Watson R, Collinson LM, Schiavo G, Warner TT (2008) The Dystonia-associated Protein TorsinA Modulates Synaptic Vesicle Recycling. *Journal of Biological Chemistry* 283:7568-7579.
- Graveland G, Williams R, DiFiglia M (1985a) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227:770-773.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985b) A Golgi study of the human neostriatum: Neurons and afferent fibers. *The Journal of Comparative Neurology* 234:317-333.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265:1826.
- Greene P, Kang UJ, Fahn S (1995) Spread of symptoms in idiopathic torsion dystonia. *Movement Disorders* 10:143-152.
- Grundmann K, Reischmann B, Vanhoutte G, Hübener J, Teismann P, Hauser TK, Bonin M, Wilbertz J, Horn S, Nguyen HP, Kuhn M, Chanarat S, Wolburg H, Van der Linden A, Riess O (2007) Overexpression of human wildtype torsinA and human Δ GAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiology of Disease* 27:190-206.
- Hamada S, Houtani T, Trifonov S, Kase M, Maruyama M, Shimizu J-I, Yamashita T, Tomoda K, Sugimoto T (2010) Histological Determination of the Areas Enriched in Cholinergic Terminals and m2 and m3 Muscarinic Receptors in the Mouse Central Auditory System. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 293:1393-1399.
- Hamann M, Raymond R, Varughesi S, Nobrega JN, Richter A (2006) Acetylcholine receptor binding and cholinergic interneuron density are unaltered in a genetic animal model of primary paroxysmal dystonia. *Brain Research* 1099:176-182.
- Hamann M, Plank J, Richter F, Bode C, Smiljanic S, Creed M, Nobrega JN, Richter A (2017) Alterations of M1 and M4 acetylcholine receptors in the genetically dystonic (dtsz) hamster and moderate antidystonic efficacy of M1 and M4 anticholinergics. *Neuroscience* 357:84-98.
- Hernández-Flores T, Hernández-González O, Pérez-Ramírez MB, Lara-González E, Arias-García MA, Duhne M, Pérez-Burgos A, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J (2015) Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M4-type receptors. *Neuropharmacology* 89:232-244.
- Hersch SM, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Levey AI (1994) Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *The Journal of Neuroscience* 14:3351.
- Hewett J, Gonzalez-Agosti C, Slater D, Ziefer P, Li S, Bergeron D, Jacoby DJ, Ozelius LJ, Ramesh V, Breakefield XO (2000) Mutant torsinA, responsible for early-onset torsion dystonia, forms membrane inclusions in cultured neural cells. *Human Molecular Genetics* 9:1403-1413.
- Hewett JW, Tannous B, Niland BP, Nery FC, Zeng J, Li Y, Breakefield XO (2007) Mutant torsinA interferes with protein processing through the secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:7271-7276.
- Higley MJ, Soler-Llavina GJ, Sabatini BL (2009) Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci* 12:1121-1128.

- Hornykiewicz O (1989) Die Neurotransmitter des Gehirns im Alter. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 5:3-12.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279-284.
- Hulme E, Birdsall N, Buckley N (1990) Muscarinic Receptor Subtypes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30:633-673.
- Ince E, Ciliax BJ, Levey AI (1997) Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27:357-366.
- Jankovic J (2004) Dystonia: medical therapy and botulinum toxin. *Advances in Neurology* 94:275-286.
- Jankovic J (2006) Treatment of dystonia. *The Lancet Neurology* 5:864-872.
- Jankovic J (2009) Treatment of hyperkinetic movement disorders. *The Lancet Neurology* 8:844-856.
- Jankovic J (2013) Medical treatment of dystonia. *Movement Disorders* 28:1001-1012.
- Jankovic J, Orman J (1987) Botulinum A toxin for cranial-cervical dystonia: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 37:616-623.
- Jin X, Costa RM (2010) Start/Stop Signals Emerge in Nigrostriatal Circuits during Sequence Learning. *Nature* 466:457-462.
- Jinnah HA, Richter A, Mink JW, Caldwell GA, Caldwell KA, Gonzalez-Alegre P, Cookson MR, Breakefield XO, DeLong MR, Hess EJ (2008) Animal models for drug discovery in dystonia. *Expert Opinion on Drug Discovery* 3:83-97.
- Jones S, Sudweeks S, Yakel JL (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends in Neurosciences* 22:555-561.
- Katzenschlager R, Sampaio C, Costa J, Lees A (2002) Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *The Journal of Neuroscience* 13:4908.
- Kawaguchi Y, Aosaki T, Kubota Y (1997) Cholinergic and GABAergic interneurons in the striatum. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 17:87-90.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences* 18:527-535.
- Kemp JM, Powell TPS (1971) The Termination of Fibres from the Cerebral Cortex and Thalamus upon Dendritic Spines in the Caudate Nucleus: A Study with the Golgi Method. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 262:429.
- Klein C, Friedman J, Bressman S, Vieregge P, Brin M, Pramstaller P, De Leon D, Hagenah J, Sieberer M, Fleet C, Kiely R, Xin W, Breakefield X, Ozelius L, Sims K (1999) Genetic testing for early-onset torsion dystonia (DYT1): introduction of a simple screening method, experiences from testing of a large patient cohort, and ethical aspects. *Genet Test* 3:323-328.

- Koós T, Tepper JM (2002) Dual Cholinergic Control of Fast-Spiking Interneurons in the Neostriatum. *The Journal of Neuroscience* 22:529.
- Kreitzer A (2009) Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Annual Review of Neuroscience* 32:127-147.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.
- Kuner R, Teismann P, Trutzel A, Naim J, Richter A, Schmidt N, von Ahsen O, Bach A, Ferger B, Schneider A (2003) TorsinA protects against oxidative stress in COS-1 and PC12 cells. *Neuroscience Letters* 350:153-156.
- Kuschka JK (2009) Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung muskarinerger Acetylcholinrezeptoren in Dystonie-Modellen. In. Fachbereich Veterinärmedizin. Institut für Pharmakologie und Toxikologie.: Freie Universität berlin.
- Kustedjo K, Bracey MH, Cravatt BF (2000) Torsin A and its Torsion Dystonia-Associated Mutant Form Are Lumenal Glycoproteins that Exhibit Distinct Subcellular Localizations. *Journal of Biological Chemistry*.
- Lapper SR, Bolam JP (1992) Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51:533-545.
- LeDoux MS (2012) Dystonia: phenomenology. *Parkinsonism & related disorders* 18:S162-S164.
- Levey A (1993a) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sciences* 52:441-448.
- Levey AI (1993b) Immunological localization of m1–m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sciences* 52:441-448.
- Levey AI (1996) Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: Implications for treatment of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13541-13546.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *The Journal of Neuroscience* 11:3218.
- Levey AI, Edmunds SM, Heilman CJ, Desmond TJ, Frey KA (1994) Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience* 63:207-221.
- Liu Z, Zolkiewska A, Zolkiewski M (2003) Characterization of human torsinA and its dystonia-associated mutant form. *Biochemical Journal* 374:117-122.
- Liu Z, Otsu Y, Vasuta C, Nawa H, Murphy TH (2007) Action-Potential-Independent GABAergic Tone Mediated by Nicotinic Stimulation of Immature Striatal Miniature Synaptic Transmission. *Journal of Neurophysiology* 98:581.
- Lohmann K, Klein C (2013) Genetics of dystonia: What's known? What's new? What's next? *Movement Disorders* 28:899-905.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M (2003) Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflügers Archiv* 446:17-29.
- Lv X, Dickerson JW, Rook JM, Lindsley CW, Conn PJ, Xiang Z (2017) M1 muscarinic activation induces long-lasting increase in intrinsic excitability of striatal projection neurons. *Neuropharmacology* 118:209-222.

- Maltese M, Martella G, Madeo G, Fagiolo I, Tassone A, Ponterio G, Sciamanna G, Burbaud P, Conn PJ, Bonsi P, Pisani A (2014) Anticholinergic drugs rescue synaptic plasticity in DYT1 dystonia: Role of M1 muscarinic receptors. *Movement Disorders* 29:1655-1665.
- Marchi M, Risso F, Viola C, Cavazzani P, Raiteri M (2002) Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *Journal of Neurochemistry* 80:1071-1078.
- Martella G, Maltese M, Nisticò R, Schirinzi T, Madeo G, Sciamanna G, Ponterio G, Tassone A, Mandolesi G, Vanni V, Pignatelli M, Bonsi P, Pisani A (2014) Regional specificity of synaptic plasticity deficits in a knock-in mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiology of Disease* 65:124-132.
- Martella G, Tassone A, Sciamanna G, Platania P, Cuomo D, Viscomi MT, Bonsi P, Cacci E, Biagioni S, Usiello A, Bernardi G, Sharma N, Standaert DG, Pisani A (2009) Impairment of bidirectional synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of DYT1 dystonia: role of endogenous acetylcholine. *Brain* 132:2336-2349.
- McNaught KSP, Kapustin A, Jackson T, Jengelley T-A, JnoBaptiste R, Shashidharan P, Perl DP, Pasik P, Olanow CW (2004) Brainstem pathology in DYT1 primary torsion dystonia. *Annals of Neurology* 56:540-547.
- Naismith TV, Heuser JE, Breakefield XO, Hanson PI (2004) TorsinA in the nuclear envelope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:7612-7617.
- Nakano K (2000) Neural circuits and topographic organization of the basal ganglia and related regions. *Brain and Development* 22:5-16.
- Nambu A, Chiken S, Shashidharan P, Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Kita H, Itakura T (2011) Reduced pallidal output causes dystonia. *Front Syst Neurosci* 5:89.
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* 439:231-250.
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999) AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Research* 9:27-43.
- Neychev VK, Fan X, Mitev VI, Hess EJ, Jinnah HA (2008) The basal ganglia and cerebellum interact in the expression of dystonic movement. *Brain* 131:2499-2509.
- Nishizuka Y (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225:1365.
- Nutt JG, Muentner MD, Aronson A, Kurland LT, Melton LJ (1988) Epidemiology of focal and generalized dystonia in Rochester, Minnesota. *Movement Disorders* 3:188-194.
- Nygaard T (1995) Dopa-responsive dystonia. *Current opinion in Neurology* 8:310-313.
- Obeso J, Rodríguez-Oroz M, Rodríguez M, Lanciego J, Artieda J, Gonzalo N, Olanow C (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 23:S8-19.
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure—diverse function. *Genes to Cells* 6:575-597.

- Oppenheim H (1911) Über eine eigenartige Krampfkrankheit des kindlichen und jugendlichen Alters (Dysbasia lordotica progressiva, Dystonia musculorum deformans). *Neurologisches Zentralblatt* 30:1090-1107.
- Ozelius LJ, Lubarr N, Bressman SB (2011) Milestones in dystonia. *Movement Disorders* 26:1106-1126.
- Ozelius LJ, Page CE, Klein C, Hewett JW, Mineta M, Leung J, Shalish C, Bressman SB, de Leon D, Brin MF, Fahn S, Corey DP, Breakefield XO (1999) The TOR1A (DYT1) Gene Family and Its Role in Early Onset Torsion Dystonia. *Genomics* 62:377-384.
- Ozelius LJ, Hewett JW, Page CE, Bressman SB, Kramer PL, Shalish C, de Leon D, Brin MF, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch NJ, Buckler AJ, Gusella JF, Breakefield XO (1997) The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 17:40-48.
- Pakhotin P, Bracci E (2007) Cholinergic Interneurons Control the Excitatory Input to the Striatum. *The Journal of Neuroscience* 27:391.
- Pancani T, Bolarinwa C, Smith Y, Lindsley CW, Conn PJ, Xiang Z (2014) M4 mAChR-Mediated Modulation of Glutamatergic Transmission at Corticostriatal Synapses. *ACS Chemical Neuroscience* 5:318-324.
- Paxinos G, Franklin K (2012) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 4 Edition: Academic Press, Elsevier Science.
- Paxinos G, Watson C (2013) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. San Diego, California: Academic Press, Elsevier Science.
- Pienaar IS, Gartside SE, Sharma P, De Paola V, Gretenkord S, Withers D, Elson JL, Dexter DT (2015) Pharmacogenetic stimulation of cholinergic pedunculopontine neurons reverses motor deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* 10:47.
- Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends in Neurosciences* 30:545-553.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G (2000) Activation of D2-Like Dopamine Receptors Reduces Synaptic Inputs to Striatal Cholinergic Interneurons. *The Journal of Neuroscience* 20:RC69.
- Quirion R, Robitaille Y, Martial J, Chabot J, Lemoine P, Pilapil C, Dalpé M (1987) Human brain receptor autoradiography using whole hemisphere sections: a general method that minimizes tissue artefacts. *Synapse* 1:446-454.
- Richter A, Hamann M, Wissel J, Volk HA (2015) Dystonia and Paroxysmal Dyskinesias: Under-Recognized Movement Disorders in Domestic Animals? A Comparison with Human Dystonia/Paroxysmal Dyskinesias. *Frontiers in Veterinary Science* 2:65.
- Richter F, Richter A (2014) Genetic animal models of dystonia: Common features and diversities. *Progress in Neurobiology* 121:91-113.
- Richter F, Gerstenberger J, Bauer A, Liang C-C, Richter A (2017) Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Behavioural Brain Research* 317:536-541.
- Risch NJ, Bressman SB, deLeon D, Brin MF, Burke RE, Greene PE, Shale H, Claus EB, Cupples LA, Fahn S (1990) Segregation analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews suggests autosomal dominant inheritance. *American Journal of Human Genetics* 46:533-538.

- Rostasy K, Augood SJ, Hewett JW, Leung JC-o, Sasaki H, Ozelius LJ, Ramesh V, Standaert DG, Breakefield XO, Hedreen JC (2003) TorsinA protein and neuropathology in early onset generalized dystonia with GAG deletion. *Neurobiology of Disease* 12:11-24.
- Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF (2004) Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *The Journal of Comparative Neurology* 469:325-339.
- Santiago MP, Potter LT (2001) Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4 muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Research* 894:12-20.
- Saunders A, Granger AJ, Sabatini BL (2015) Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *eLife* 4:e06412.
- Scarduzio M, Zimmerman CN, Jaunarajs KL, Wang Q, Standaert DG, McMahon LL (2017) Strength of cholinergic tone dictates the polarity of dopamine D2 receptor modulation of striatal cholinergic interneuron excitability in DYT1 dystonia. *Experimental Neurology* 295:162-175.
- Schenkel J (2006) *Transgene Tiere: mit ... 20 Tabellen*. Berlin: Springer.
- Schiffmann SN, Jacobs O, Vanderhaeghen J-J (1991) Striatal Restricted Adenosine A2 Receptor (RDC8) Is Expressed by Enkephalin but Not by Substance P Neurons: An In Situ Hybridization Histochemistry Study. *Journal of Neurochemistry* 57:1062-1067.
- Schliebs R, Arendt T (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 113:1625-1644.
- Sciamanna G, Ponterio G, Tassone A, Maltese M, Madeo G, Martella G, Poli S, Schirinzi T, Bonsi P, Pisani A (2014) Negative allosteric modulation of mGlu5 receptor rescues striatal D2 dopamine receptor dysfunction in rodent models of DYT1 dystonia. *Neuropharmacology* 85:440-450.
- Sciamanna G, Tassone A, Martella G, Mandolesi G, Puglisi F, Cuomo D, Madeo G, Ponterio G, Standaert DG, Bonsi P, Pisani A (2011) Developmental Profile of the Aberrant Dopamine D2 Receptor Response in Striatal Cholinergic Interneurons in DYT1 Dystonia. *PLOS ONE* 6:e24261.
- Servent D, Fruchart-Gaillard C (2009) Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *Journal of Neurochemistry* 109:1193-1202.
- Shafir Y, Levy Y, Beharab A, Nitzam M, Steinherz R (1986) Acute Dystonic Reaction to Bethanechol—a Direct Acetylcholine Receptor Agonist. *Developmental Medicine & Child Neurology* 28:646-648.
- Sharma N, Baxter MG, Petravic J, Bragg DC, Schienda A, Standaert DG, Breakefield XO (2005) Impaired Motor Learning in Mice Expressing TorsinA with the DYT1 Dystonia Mutation. *The Journal of Neuroscience* 25:5351-5355.
- Shashidharan P, Sandu D, Potla U, Armata IA, Walker RH, McNaught KS, Weisz D, Sreenath T, Brin MF, Olanow CW (2005) Transgenic mouse model of early-onset DYT1 dystonia. *Human Molecular Genetics* 14:125-133.
- Shen W, Tian X, Day M, Ulrich S, Tkatch T, Nathanson NM, Surmeier DJ (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10:1458-1466.

- Sirviö J, Riekkinen PJ (1992) Brain and cerebrospinal fluid cholinesterases in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and aging. A critical review of clinical and experimental studies. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia* Section 4:337-358.
- Smeets WJAJ, Marín O, González A (2000) Evolution of the basal ganglia: new perspectives through a comparative approach. *Journal of Anatomy* 196:501-517.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends in Neurosciences* 13:259-265.
- Song C-H, Bernhard D, Hess EJ, Jinnah HA (2014) Subtle Microstructural Defects of the Cerebellum in a Knock-in Mouse Model of DYT1 Dystonia. *Neurobiology of disease* 62:10.1016/j.nbd.2013.1010.1003.
- Song C-H, Fan X, Exeter CJ, Hess EJ, Jinnah HA (2012) Functional Analysis of Dopaminergic Systems in a DYT1 Knock-in Mouse Model of Dystonia. *Neurobiology of disease* 48:66-78.
- Song CH, Bernhard D, Bolarinwa C, Hess EJ, Smith Y, Jinnah HA (2013) Subtle microstructural changes of the striatum in a DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Neurobiol Dis* 54:362-371.
- Stamelou M, Edwards MJ, Hallett M, Bhatia KP (2012) The non-motor syndrome of primary dystonia: clinical and pathophysiological implications. *Brain* 135:1668-1681.
- Sugaya K, Clamp C, Bryan D, McKinney M (1997) mRNA for the m4 muscarinic receptor subtype is expressed in adult rat brain cholinergic neurons. *Molecular Brain Research* 50:305-313.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences* 30:228-235.
- Tanabe LM, Martin C, Dauer WT (2012) Genetic Background Modulates the Phenotype of a Mouse Model of DYT1 Dystonia. *PLoS ONE* 7:e32245.
- Tanabe LM, Kim CE, Alagem N, Dauer WT (2009) Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nature reviews Neurology* 5:598-609.
- Thenganatt MA, Fahn S (2012) Botulinum Toxin for the Treatment of Movement Disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 12:399-409.
- Threlfell S, Cragg SJ (2011) Dopamine Signaling in Dorsal Versus Ventral Striatum: The Dynamic Role of Cholinergic Interneurons. *Frontiers in Systems Neuroscience* 5:11.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350-4354.
- Trepel M (2015) *Neuroanatomie*. München: Elsevier.
- Uluç AM, Vo A, Argyelan M, Tanabe L, Schiffer WK, Dewey S, Dauer WT, Eidelberg D (2011) Cerebellothalamocortical pathway abnormalities in torsinA DYT1 knock-in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:6638-6643.
- Vale RD (2000) Aaa Proteins: Lords of the Ring. *The Journal of Cell Biology* 150:f13-f20.

- van der Staay FJ (2006) Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews* 52:131-159.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:research0034.0031-research0034.0011.
- Vidailhet M, Vercueil L, Houeto J-L, Krystkowiak P, Benabid A-L, Cornu P, Lagrange C, Tézenas du Montcel S, Dormont D, Grand S, Blond S, Detante O, Pillon B, Ardouin C, Agid Y, Destée A, Pollak P (2005) Bilateral Deep-Brain Stimulation of the Globus Pallidus in Primary Generalized Dystonia. *New England Journal of Medicine* 352:459-467.
- Vilaró MT, Wiederhold K-H, Palacios JM, Mengod G (1992) Muscarinic M2-selective ligands also recognize M4 receptors in the rat brain: Evidence from combined in situ hybridization and receptor autoradiography. *Synapse* 11:171-183.
- Vitek JL (2002) Pathophysiology of dystonia: A neuronal model. *Movement Disorders* 17:S49-S62.
- Vitex J, Giroux M (2000) Physiology of hypokinetic and hyperkinetic movement disorders: model for dyskinesia. *Ann Neurol* 47:S131-140.
- Volpicelli LA, Levey AI (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Progress in Brain Research* 145:59-66.
- Wang H, Chung-Davidson Y-W, Li K, Scott AM, Li W (2012) Quantification of monoamine neurotransmitters and melatonin in sea lamprey brain tissues by high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta* 89:383-390.
- Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990) Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:7050-7054.
- Wenning GK, Kiechl S, Seppi K, Müller J, Högl B, Saletu M, Rungger G, Gasperi A, Willeit J, Poewe W (2005) Prevalence of movement disorders in men and women aged 50–89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study. *The Lancet Neurology* 4:815-820.
- Wess J, Eglen RM, Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6:721-733.
- Wichmann T, DeLong MR (2003) Pathophysiology of Parkinson's Disease: The MPTP Primate Model of the Human Disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences* 991:199-213.
- Wilson CJ (2005) The Mechanism of Intrinsic Amplification of Hyperpolarizations and Spontaneous Bursting in Striatal Cholinergic Interneurons. *Neuron* 45:575-585.
- Woolf NJ, Butcher LL (2011) Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research* 221:488-498.
- Yan Z, Song W-J, Surmeier DJ (1997) D2 Dopamine Receptors Reduce N-Type Ca²⁺ Currents in Rat Neostriatal Cholinergic Interneurons Through a Membrane-Delimited, Protein-Kinase-C-Insensitive Pathway. *Journal of Neurophysiology* 77:1003.

- Yan Z, Flores-Hernandez J, Surmeier DJ (2001) Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103:1017-1024.
- Yokoi F, Dang MT, Liu J, Gandre JR, Kwon K, Yuen R, Li Y (2015) Decreased dopamine receptor 1 activity and impaired motor-skill transfer in Dyt1 Δ GAG heterozygous knock-in mice. *Behavioural brain research* 279:202-210.
- Yung KKL, Smith AD, Levey AI, Bolam JP (1996) Synaptic Connections Between Spiny Neurons of the Direct and Indirect Pathways in the Neostriatum of the Rat: Evidence from Dopamine Receptor and Neuropeptide Immunostaining. *European Journal of Neuroscience* 8:861-869.
- Zhang L, McCarthy DM, Sharma N, Bhide PG (2015) Dopamine Receptor and G α (olf) Expression in DYT1 Dystonia Mouse Models during Postnatal Development. *PLoS ONE* 10:e0123104.
- Zhang L, Yokoi F, Jin YH, DeAndrade MP, Hashimoto K, Standaert DG, Li Y (2011) Altered dendritic morphology of Purkinje cells in Dyt1 DeltaGAG knock-in and purkinje cell-specific Dyt1 conditional knockout mice. *PLoS One* 6:e18357.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002) Characterization of Central Inhibitory Muscarinic Autoreceptors by the Use of Muscarinic Acetylcholine Receptor Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 22:1709.
- Zhou F-M, Liang Y, Dani JA (2001) Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci* 4:1224-1229.
- Zhou F-M, Wilson CJ, Dani JA (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of Neurobiology* 53:590-605.
- Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M (2016) Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience* 36:9161-9172.

9 Anlagen

9.1 Liste Chemikalien

Die folgende Tabelle gibt alphabetisch geordnete Auskunft über die verwendeten Chemikalien.

Substanz	Firma
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
99% Ethanol	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Glycerol 98 %	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl 99,5 %	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH, 1 M	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Carl- Roth g, Karlsruhe, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Ambion, ThermoFischer scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenobarbital	Narkoderm, 182,3 mg Pentobarbital/ml cp-Pharma, Burgdorf Deutschland
RNAse Away	Molecular Bio Products, Toronto, Kanada
Saccharose	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt, Deutschland
TBE-Puffer 10x	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris PUFFERAN (Tris- Base)	Carl-Roth, Karlsruhe Deutschland
Triton X 100 (624g/mol)	Carl-Roth, Karlsruhe Deutschland

9.2 Liste Geräte/ Materialien

Die folgende Liste gibt alphabetisch geordnete Auskunft über die verwendeten Geräte und Materialien.

Geräte/Material	Firma
0,2 ml Premium PCR Tubes	Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
0,650 ml Multi-Ultra Tubes	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäße	Axygen, Union City, USA
15 ml Cellstar Tubes (Falkontubes)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
2 ml Reaktionsgefäße	Dr. Iona Schubert- Laborfachhandel, Leipzig, Deutschland
5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
50 ml Cellstar Tubes (Falkontubes)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Analytic AC 210 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
ART Tips 10 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
ART Tips 1000 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
ART Tips 20 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

ART Tips 200 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Axioskop II Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Basler acA 1300-60gc Kamera	Basler, Ahrensburg, Deutschland
Cellstar 10 ml serological pipette	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar 24 Well Cell Culture Plate	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar 48 Well Suspension Culture Plate	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Combitips Plus 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cool LEDpe300 Lampe	CoolLED, Andover, USA
Deckgläser 24x60 mm	Carl- Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Gewebestanze mit Auswurf ID 1,0 mm, steril	Imtegra, Rostock, Deutschland
Elektrophoresekammer	Sub-Cell, Model 192, Bio-Rad, Hercules, USA
ep T.I.P. 100-5000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus 0,5-5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Finnpipette F2 0,2-2 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F2 100-1000 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F2 20-200 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F2 2-20 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finntip Flex mit/ohne Filter 10 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finntip Flex mit/ohne Filter 1000 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finntip Flex mit/ohne Filter 20 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Finntip Flex mit/ohne Filter 200 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Gelkammer	Bio-Rad, Hercules, USA
IKA Ultra-Turrax dispersers T8 basic	Ika-Werke, Deutschland
Implen Nanometer P 360	Implen, München, Deutschland
Kryoröhrchen CRYO.S	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Kryostat Hypax C 50	Zeiss, Jena, Deutschland
Laboratory LC 620 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Microm Sec 3Te low profile blade	ThermoScientific, Waltham, USA
Mini- Tischzentrifuge	Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Mini-Pump Variable Flow	Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Olympus Fluoview FV1200	Olympus, Hamburg, Deutschland
Orbitalschüttler SeaStar	Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA
Pellet Pistill Homogenisiergerät	Scherf Präzision Europa, Meiningen-Dreissigacker, Deutschland
PiKo PCR Plate, 96-Well	Finnzymes, Espoo, Finnland
PiKo- Real 96 Real-Time PCR Thermocycler	ThermoScientific, Waltham, USA
PowerPac Basic, 300 V, 400 mA, 75 W	Bio-Rad, Hercules, USA
puReTaq Ready-To-Go PCR Bead	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
Superforst Ultra Plus Objektträger	ThermoScientific, Waltham, USA
Thermocycler Gene AMP PCR System 9700	GeneAMP PCR System 9700, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Tischschüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

9.3 Puffer und Lösungen

Im Folgenden werden die verwendeten Puffer und Lösungen dargestellt. Dazu wurden folgende Abkürzungen verwendet: l= Liter, ml= Milliliter, µl= Mikroliter, g= Gramm, M= Mol/ molare, mM= Millimol/millimolar, ddH₂O= doppeldistilliertes Wasser.

I. Gefrierschutzlösung (Cryoprotectant-Lösung)

85,6g Saccharose
0,66g MgCl₂
500 ml Glycerol
500 ml 0,1 M PBS

II. 50 mM Tris-Base Salzlösung (TBS):

9g NaCl
6,057 g TRIS PUFFERAN
Auf 1l ddH₂O
Auf pH=7,6 einstellen

III. Blocking Lösung I (10% NDS, 0,5% Triton X 100, TBS)

1 ml TBS
100 µl normales Eselserum (NDS)
5 µl Triton X 100

IV. Blocking Lösung II (mouse-on-mouse block)

1 Tropfen MKB 2213 MOM IgG
2,5 ml TBS

V. Träger-Lösung (2% NDS, 0,5% Triton X 100, TBS)

1 ml TBS
20 µl NDS
5 µl Triton X 100

VI. 4% Paraformaldehyd (PFA)

750 ml ddH₂O auf 52°C erhitzen
40 g PFA dazugeben
nicht gelöstes PFA durch Zugabe von 10 N NaOH in Lösung bringen
auf Eis Temperatur auf 22-24°C einstellen
Lösung filtrieren
pH-Wert auf 7,4 einstellen

VII. 0,4 M phosphatgepufferte Salzlösung (0,4 M PBS)

40 g dibasisches Na_2HPO_4
 13,44 g monobasisches NaH_2PO_4
 36 g NaCl
 1l ddH_2O

VIII. 10% Saccharose-Lösung

100 g Saccharose in 900 ml 0,1 M PBS lösen
 mit 0,1 M PBS auf 1l auffüllen

IX. 20% Saccharose Lösung

200 g Saccharose in 900 ml 0,1 M PBS lösen
 mit 0,1 M PBS auf 1l auffüllen

X. 30% Saccharose-Lösung

200 g Saccharose in 900 ml 0,1 M PBS lösen
 mit 0,1 M PBS auf 1l auffüllen

XI. 1%iges Agarosegel für die PCR

3 g Agarose abwiegen
 300 ml TBE-Puffer dazu
 Aufkochen bis Flüssigkeit klar
 Abkühlen und mit 24 μl Gelred Nucleic Acid Stain versetzen
 in die Elektrophoresekammer mit Kamm gießen

9.4 Verwendete Software

Die folgende Tabelle gibt eine alphabetische Übersicht über die verwendete Software.

Software Name	Firma
GeNorm, Stand 2008	Ghent University, Ghent, Belgien
Graph Pad Software	Graph Pad Software Link https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm aufgerufen am 09.08.2017
ImageJ v1,47	Freie Software vom National Institut of Health, USA
Microsoft Word	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Microsoft Excel	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Olympus Fluoview Version 4.2.	Olympus, Hamburg, Deutschland
Sigma12,5Plot Version	Systat Software, Erkrath, Deutschland
Stereoinvestigator Software	MBF Bioscience, Williston, USA

9.5 Relative mRNA-Expression

Statistisch signifikante Ausreißer (in den Tabellen als durchgestrichene Zahl gekennzeichnet) wurden mit dem Grubbs-Test identifiziert ($P > 0,05$) und für die statistische Auswertung nicht verwendet. Für alle vier Subtypen des mAChR (M1-M4) wurde ein Wildtyptier (TMN 16-7) aus der Auswertung für den motorischen Cortex genommen, da hier die ct-Werte der „house keeping“ Gene stark abwichen.

9.5.1 Relative M1 mRNA-Expression

Die folgende Tabelle zeigt die Endwerte sortiert nach Gruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten und Standardfehlern:

Striatum				Motorischer Cortex			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.54525387	TMN 14-1	0.61450643	TMN 14-2	0.74483873	TMN 14-1	0.64394081
TMN 14-4	0.37566015	TMN 16-4	0.60482234	TMN 14-4	0.63654452	TMN 16-4	0.77826497
TMN 15-4	0.17575854	TMN 15-1	0.51109616	TMN 15-4	0.78935709	TMN 15-1	0.52850902
TMN 16-5	0.53187778	TMN 15-2	0.62272481	TMN 16-5	0.76954806	TMN 15-2	0.50115658
TMN 16-6	0.37587721	TMN 15-3	0.765779	TMN 16-6	0.95843334	TMN 15-3	0.45770819
TMN 16-7	0.34908897	TMN 15-5	0.87660572	TMN 16-7		TMN 15-5	0.65330715
MW	0.39225275		0.66592241	MW	0.77974435		0.59381445
SD	0.13577984		0.13158481	SD	0.11602879		0.11954014
SEM	0.05543189		0.05371928	SEM	0.05188965		0.04880206

Shapiro-Wilk Test: $p=0.541$

Equal Variance Test: $p=0.959$

t-Test: $p=0.005$

Shapiro-Wilk Test: $p=0.440$

Equal Variance Test: $p=0.884$

t-Test: $p=0.029$

Präfrontaler Cortex				Cerebellum			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.47152843	TMN 14-1	0.36275901	TMN 14-2	0.04161748	TMN 14-1	0.78867346
TMN 14-4	0.87382523	TMN 16-4	0.51479978	TMN 14-4	0.09014138	TMN 16-4	0.036272
TMN 15-4	0.12154676	TMN 15-1	0.50624816	TMN 15-4	0.49769484	TMN 15-1	0.07296424
TMN 16-5	0.70201966	TMN 15-2	0.32750375	TMN 16-5	0.02376529	TMN 15-2	0.03987606
TMN 16-6	0.60587133	TMN 15-3	0.39479255	TMN 16-6	0.20003624	TMN 15-3	0.27579471
TMN 16-7	0.29126751	TMN 15-5	0.72824712	TMN 16-7	0.08666941	TMN 15-5	0.0720429
MW	0.51100982		0.47239173	MW	0.15665411		0.21427056
SD	0.27518918		0.14658798	SD	0.17799183		0.29530223
SEM	0.11234551		0.05984429	SEM	0.07266486		0.12055663

Shapiro-Wilk Test: $p=1.00$

Equal Variance Test: $p=0.153$

t-Test: $p=0.768$

Shapiro-Wilk Test: $p<0.05$

Equal Variance Test: $p=0.662$

t-Test: $p=0.691$

9.5.2 Relative M2 mRNA-Expression

Die folgende Tabelle zeigt die Endwerte sortiert nach Gruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten und Standardfehlern. Ein DYT1 KI Tier (TMN 15-5) wurde aus der Auswertung für den motorischen Cortex entfernt, da hier der ct-Wert stark von den anderen abwich.

Striatum				Motorischer Cortex			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.45533492	TMN 14-1	0.9228491	TMN 14-2	0.64245471	TMN 14-1	0.38377518
TMN 14-4	0.30760837	TMN 16-4	0.59237528	TMN 14-4	0.55286533	TMN 16-4	0.51109616
TMN 15-4	0.15840246	TMN 15-1	0.33993559	TMN 15-4	0.74333443	TMN 15-1	0.44237242
TMN 16-5	0.41633979	TMN 15-2	0.69898497	TMN 16-5	0.81342618	TMN 15-2	0.38689125
TMN 16-6	0.23624134	TMN 15-3	0.65292989	TMN 16-6	0.46935453	TMN 15-3	0.47604395
TMN 16-7	0.25613921	TMN 15-5	0.87660572	TMN 16-7		TMN 15-5	
MW	0.30501101		0.68061342	MW	0.64428704		0.44003579
SD	0.11279176		0.21073317	SD	0.1390873		0.05554553
SEM	0.04604704		0.08603146	SEM	0.06220173		0.02267637

Shapiro-Wilk Test: p=0.838

Equal Variance Test: p=0.301

t-Test: p=0.003

Shapiro-Wilk Test: p=0.999

Equal Variance Test: p<0.05

t-Test: p=0.016

Präfrontaler Cortex				Cerebellum			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.4847849	TMN 14-1	0.26555514	TMN 14-2	0.06752973	TMN 14-1	0.78867346
TMN 14-4	0.31762947	TMN 16-4	0.07123598	TMN 14-4	0.18924582	TMN 16-4	0.06228377
TMN 15-4	0.12700143	TMN 15-1	0.10173702	TMN 15-4	0.30530716	TMN 15-1	0.07984431
TMN 16-5	0.71511164	TMN 15-2	0.16280873	TMN 16-5	0.14259546	TMN 15-2	0.12399324
TMN 16-6	0.76511579	TMN 15-3	0.30689846	TMN 16-6	0.15749013	TMN 15-3	0.17036096
TMN 16-7	0.2667851	TMN 15-5	0.49055949	TMN 16-7	0.17174421	TMN 15-5	0.28917205
MW	0.44607218		0.23313247	MW	0.17231875		0.25238796
SD	0.25538983		0.15568043	SD	0.07753305		0.27498355
SEM	0.10426246		0.06355627	SEM	0.03165274		0.11226156

Shapiro-Wilk Test: p=0.480

Equal Variance Test: p=0.181

t-Test: p=0.112

Shapiro-Wilk Test: p<0.05

Equal Variance Test: p=0.281

t-Test: p=0.508

9.5.3 Relative M3 mRNA-Expression

Die folgende Tabelle zeigt die Endwerte sortiert nach Gruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten und Standardfehlern. Zwei DYT1 KI Tiere (TMN 15-3 und 15-5) wurden aus der Auswertung für das Cerebellum genommen, da hier keine ct-Werte gemessen wurden.

Striatum				Motorischer Cortex			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.33797771	TMN 14-1	0.4630265	TMN 14-2	0.79461797	TMN 14-1	0.4735756
TMN 14-4	0.33778254	TMN 16-4	0.38233698	TMN 14-4	0.49827013	TMN 16-4	0.5377472
TMN 15-4	0.11008323	TMN 15-1	0.29320874	TMN 15-4	0.62506726	TMN 15-1	0.476319
TMN 16-5	0.27152683	TMN 15-2	0.70629037	TMN 16-5	0.69035803	TMN 15-2	0.44442134
TMN 16-6	0.11635996	TMN 15-3	0.53218509	TMN 16-6	0.75895346	TMN 15-3	0.47384923
TMN 16-7	0.24372621	TMN 15-5	0.87660572	TMN 16-7		TMN 15-5	0.60464769
MW	0.23624275		0.54227557	MW	0.67345337		0.50176001
SD	0.10222466		0.21571944	SD	0.1175875		0.05897337
SEM	0.04173304		0.08806709	SEM	0.05258673		0.02407578

Shapiro-Wilk Test: p=0.950

Equal Variance Test: p=0.185

t-Test: p=0.011

Shapiro-Wilk Test: p=0.542

Equal Variance Test: p=0.082

t-Test: p=0.012

Präfrontaler Cortex				Cerebellum			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.49497126	TMN 14-1	0.41718234	TMN 14-2	0.03865146	TMN 14-1	0.78867346
TMN 14-4	0.87382523	TMN 16-4	0.39467854	TMN 14-4	0.04293605	TMN 16-4	0.02835997
TMN 15-4	0.15349356	TMN 15-1	0.34898816	TMN 15-4	0.14847926	TMN 15-1	0.04205244
TMN 16-5	0.68203452	TMN 15-2	0.2165717	TMN 16-5	0.10844234	TMN 15-2	0.02282354
TMN 16-6	0.67537	TMN 15-3	0.432019	TMN 16-6	0.10141432	TMN 15-3	
TMN 16-7	0.28395811	TMN 15-5	0.47057611	TMN 16-7	0.12471152	TMN 15-5	
MW	0.52727545		0.38000264	MW	0.09410583		0.22047735
SD	0.2705324		0.08964211	SD	0.04437491		0.37888362
SEM	0.11044439		0.03659624	SEM	0.01811598		0.15467859

Shapiro-Wilk Test: p=0.912

Equal Variance Test: p<0.05

t-Test: p=0.310

Shapiro-Wilk Test: p=0.912

Equal Variance Test: p<0.05

t-Test: p=0.234

9.5.4 Relative M4 mRNA-Expression

Die folgende Tabelle zeigt die Endwerte sortiert nach Gruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten und Standardfehlern:

Striatum				Motorischer Cortex			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.74915354	TMN 14-1	0.7950771	TMN 14-2	0.765779	TMN 14-1	0.63654452
TMN 14-4	0.43906304	TMN 16-4	0.65198771	TMN 14-4	0.62488676	TMN 16-4	0.73458432
TMN 15-4	0.21315872	TMN 15-1	0.42435199	TMN 15-4	0.83822919	TMN 15-1	0.51168695
TMN 16-5	0.71161393	TMN 15-2	0.60081802	TMN 16-5	0.67148015	TMN 15-2	0.43729134
TMN 16-6	0.41465977	TMN 15-3	0.74397876	TMN 16-6	0.65538596	TMN 15-3	0.45036502
TMN 16-7	0.31643915	TMN 15-5	0.87660572	TMN 16-7		TMN 15-5	0.61735262
MW	0.47401469		0.68213655	MW	0.71115221		0.56463746
SD	0.21437131		0.16023284	SD	0.08839983		0.11739713
SEM	0.08751672		0.06541478	SEM	0.03953361		0.04792718

Shapiro-Wilk Test: p=0.620

Equal Variance Test: p=0.595

t-Test: p=0.086

Shapiro-Wilk Test: p=0.425

Equal Variance Test: p=0.639

t-Test: p=0.048

Präfrontaler Cortex				Cerebellum			
WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis	WT	Ergebnis	DYT1 KI	Ergebnis
TMN 14-2	0.43995158	TMN 14-1	0.35859236	TMN 14-2	0.35151707	TMN 14-1	0.78867346
TMN 14-4	0.54667299	TMN 16-4	0.47811072	TMN 14-4	0.1879386	TMN 16-4	0.08808255
TMN 15-4	0.08282729	TMN 15-1	0.5721968	TMN 15-4	0.43477272	TMN 15-1	0.38778619
TMN 16-5	0.58896345	TMN 15-2	0.42032679	TMN 16-5	0.23245124	TMN 15-2	0.23379781
TMN 16-6	0.57984934	TMN 15-3	0.49511423	TMN 16-6	0.23953914	TMN 15-3	0.12557896
TMN 16-7	0.29876506	TMN 15-5	0.9069951	TMN 16-7	0.23004691	TMN 15-5	0.29593112
MW	0.42283828		0.538556	MW	0.27937761		0.31997502
SD	0.199439		0.19431158	SD	0.09373958		0.2544976
SEM	0.08142063		0.07932737	SEM	0.03826902		0.10389821

Shapiro-Wilk Test: p=0.394

Equal Variance Test: p=0.539

t-Test: p=0.702

Shapiro-Wilk Test: p=0.116

Equal Variance Test: p=0.091

t-Test: p=0.719

9.6 Intensitätsmessung der Immunhistologie

9.6.1 Bildausschnitte der Übersichtsfärbung

Es wurden Bilder von den immunhistochemischen Untersuchungen von den mAChR-Subtypen M1 und M4 angefertigt und im Anschluss stellvertretend für die Farbintensität die Pixelwerte der Bilder erstellt und ausgewertet. Dabei wurden die Pixelwerte für die einzelnen Regionen von denen des Corpus callosum (Negativkontrolle) abgezogen. Es wurden nur Bildausschnitte mit der Software ImageJ analysiert. Pro Bild wurde eine ca. 35.000 Pixel² große Fläche analysiert. Da die Flächen per Hand gezeichnet werden mussten, ergibt sich eine leichte Variabilität in der Größe.

Die nachfolgenden Tabellen geben die Größe des analysierten Bildausschnittes (Area), den Mittelwert der Pixelwerte, die Standardabweichung (SD) und den Standardfehler (SEM) wider. Die Daten wurden nach Tieren sortiert.

a. M1:

DYT1 KI	Gesamt-Striatum	dl Striatum	dm Striatum	vl Striatum	vm Striatum	Cortex	Corpus callosum
TMN 134-1	37.025	34.351	37.956	36.468	39.325	18.249	34.491
TMN 134-2	34.193	31.748	35.828	33.485	35.712	19.282	32.388
TMN 134-3	32.039	29.603	33.40	31.716	33.438	19.209	33.297
TMN 134-4	41.416	37.052	43.533	40.21	44.871	21.375	39.228
TMN 134-5	32.815	30.671	33.471	33.380	33.739	21.165	32.510
TMN 133-1	39.584	37.092	41.968	38.134	41.143	21.777	38.569
MW	36.1794	33.419	37.693	35.566	38.038	20.176	35.080
SD	3.798	3.239	4.293	3.252	4.539	1.443	3.058
SEM	1.550	1.322458	1.752	1.327	1.853	0.589	1.248
WT	Gesamt-Striatum	dl Striatum	dm Striatum	vl Striatum	vm Striatum	Cortex	Corpus callosum
BL6 36-2	35.796	33.746	35.627	35.556	38.258	19.763	32.838
BL6 36-3	36.750	33.149	37.683	37.784	38.386	20.630	33.473
BL6 36-4	33.499	30.553	33.563	34.259	35.622	20.311	32.872
BL6 37-1	35.375	33.665	36.005	34.814	37.014	21.328	34.448
BL6 37-2	35.504	32.826	37.420	34.525	37.247	22.395	35.017
BL6 37-3	36.937	35.231	38.517	35.775	38.224	20.094	32.954
MW	35.644	33.195	36.469	35.452	37.459	20.753	33.600
SD	1.233	1.535	1.785	1.283	1.067	0.964	0.924
SEM	0.503	0.626	0.728	0.524	0.435	0.393	0.377

b. M4:

DYT1 KI	Gesamt-Striatum	dl Striatum	dm Striatum	vl Striatum	vm Striatum	Cortex	Corpus callosum
TMN 134-1	41.793	43.203	41.178	44.788	38.003	24.617	33.991
TMN 134-2	43.183	44.212	43.031	45.175	40.314	27.738	37.112
TMN 134-3	42.522	43.192	42.649	43.425	40.823	27.399	35.105
TMN 134-4	40.332	40.077	41.061	41.902	38.286	25.019	34.231
TMN 134-5	39.261	39.792	39.524	40.106	37.622	26.045	33.344
TMN 133-1	36.303	36.686	35.698	37.088	35.740	20.746	29.047
MW	40.566	41.194	40.523	42.081	38.465	25.261	33.805
SD	2.534	2.852	2.676	3.084	1.863	2.536	2.671
SEM	1.034	1.164	1.092	1.259	0.760	1.035	1.090
WT	Gesamt-Striatum	dl Striatum	dm Striatum	vl Striatum	vm Striatum	Cortex	Corpus callosum
BL6 36-2	43.729	45.165	43.170	45.427	41.153	24.639	34.123
BL6 36-3	44.074	45.161	43.956	47.325	39.853	28.140	36.584
BL6 36-4	42.541	43.228	42.641	43.467	40.829	27.334	35.106
BL6 37-1	44.719	44.253	44.257	47.850	42.514	25.904	36.84
BL6 37-2	44.865	46.189	45.544	45.820	41.907	28.726	38.06
BL6 37-3	40.924	42.707	41.829	42.876	36.285	23.376	34.447
MW	43.475	44.450	43.566	45.461	40.423	26.353	35.860
SD	1.501	1.312	1.309	1.998	2.223	2.087	1.543
SEM	0.613	0.535	0.534	0.815	0.907	0.852	0.629

9.6.2 ChAT-positive Zellen

Die folgende Tabelle zeigt die Entwerte von der Größe der ChAT-Neurone und der grünen und roten Fluoreszenz. Diese wurden nach Gruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten, Standardabweichungen und Standardfehlern sortiert:

DYT1 KI	Striatum-Region	Größe ChAT-Neurone	rote Fluoreszenz	grüne Fluoreszenz
TMN 134-1	dl	8.83E-07	111.795	112.617
		1.23E-06	130.634	119.268
		9.93E-07	120.047	106.186
		1.75E-06	99.055	113.931
		9.75E-07	113.695	159.895
		1.33E-06	107.514	157.228
		8.41E-07	124.005	147.417
		1.69E-06	95.823	99.265
		MW	1.21E-06	112.821
		SD	3.55E-07	11.970
		SEM	1.25E-07	4.232
	dm	1.21E-06	126.986	114.87

		1.10E-06	124.399	101.905
	MW	1.15E-06	125.693	108.388
	SD	7.57E-08	1.829	9.168
	SEM	5.35E-08	1.294	6.483
	vl	2.10E-06	114.041	118.618
	vm	8.31E-07	107.59	112.071
		1.61E-06	107.447	99.452
		1.22E-06	102.526	101.737
	MW	1.22E-06	105.854	104.420
	SD	3.90E-07	2.883	6.724
	SEM	2.25E-07	1.665	3.882
TMN 134-2	dl	9.47E-07	108.825	111.456
		9.62E-07	110.459	121.216
		9.25E-07	109.027	89.404
		9.47E-07	72.604	61.232
		7.63E-07	66.598	55.83
	MW	9.09E-07	93.503	87.828
	SD	8.25E-08	21.931	29.184
	SEM	3.69E-08	9.808	13.051
	dm	8.57E-07	102.185	91.462
		7.27E-07	99.843	101.222
		1.14E-06	95.74	92.84
		7.84E-07	85.279	73.401
	MW	8.76E-07	95.762	89.731
	SD	1.82E-07	7.479	11.710
	SEM	9.09E-08	3.739	5.855
	vm	9.57E-07	92.647	89.825
		9.72E-07	103.344	100.182
		8.38E-07	88.546	71.837
		1.47E-06	99.946	111.862
		1.06E-06	95.096	85.683
	MW	1.06E-06	95.916	91.878
	SD	2.44E-07	5.854	15.104
	SEM	1.09E-07	2.618	6.755
	vl	8.38E-07	106.579	136.858
		6.67E-07	110.684	162.548
		1.62E-06	94.02	133.947
	MW	1.04E-06	103.761	144.451
	SD	5.09E-07	8.682	15.740
	SEM	2.94E-07	5.013	9.087
TMN 134-3	dl	9.57E-07	81.989	97.82
		1.26E-06	80.868	93.14
		7.79E-07	88.788	100.837
		1.07E-06	90.035	111.482
		1.37E-06	93.361	104.544
		8.46E-07	79.689	96.033
	MW	1.05E-06	85.788	100.643

	SD	2.34E-07	5.661	6.607
	SEM	9.54E-08	2.311	2.697
vl		7.61E-07	119.324	127.131
		3.16E-07	81.562	82.991
	MW	5.39E-07	100.443	105.061
	SD	3.15E-07	26.702	31.212
	SEM	2.22E-07	18.881	22.070
dm		1.29E-06	93.261	102.463
vm				
TMN 134-4	dl	9.65E-07	115.975	122.536
		1.25E-06	136.448	127.171
		2.02E-06	96.376	93.792
		1.55E-06	131.031	153.371
		1.33E-06	131.496	123.404
		1.19E-06	112.339	106.473
		1.05E-06	139.798	156.666
		7.31E-07	145.574	155.806
	MW	1.26E-06	126.130	129.902
	SD	3.94E-07	16.487	23.588
	SEM	1.39E-07	5.829	8.340
	vl	1.20E-06	100.376	151.467
		1.12E-06	104.106	136.729
		1.57E-06	82.582	123.127
	MW	1.30E-06	95.688	137.108
	SD	2.39E-07	11.502	14.174
	SEM	1.38E-07	6.641	8.183
	dm	1.33E-06	113.9	147.496
		9.95E-07	96.499	110.862
	MW	1.16E-06	105.200	129.179
	SD	2.39E-07	12.304	25.904
	SEM	1.69E-07	8.701	18.317
	vm	1.08E-06	79.218	112.734
		1.23E-06	103.157	139.623
		2.05E-06	82.063	95.255
	MW	1.45E-06	88.146	115.871
	SD	5.25E-07	13.078	22.350
	SEM	3.03E-07	7.550	12.904
TMN 134-5	dl	1.22E-06	158.864	135.049
		1.23E-06	150.926	130.008
		1.07E-06	153.885	124.294
		1.83E-06	190.93	225.454
		1.18E-06	160.669	160.314
		1.35E-06	134.407	133.901
		6.81E-07	155.75	213.568
		9.54E-07	172.904	191.64
	MW	1.19E-06	159.792	164.279
	SD	3.32E-07	16.550	40.509

	SEM	1.17E-07	5.851	14.322
vl		1.53E-06	139.085	223.202
		6.45E-07	126.911	189.227
	MW	1.09E-06	132.998	206.215
	SD	6.26E-07	8.608	24.024
	SEM	4.43E-07	6.087	16.988
dm		1.29E-06	161.849	136.651
		1.26E-06	165.882	156.431
		1.16E-06	139.876	128.36
	MW	1.24E-06	155.869	140.481
	SD	6.84E-08	13.996	14.422
	SEM	3.95E-08	8.081	8.327
vm		9.13E-07	126.229	131.239
		1.48E-06	117.541	107.331
		1.11E-06	115.995	101.655
	MW	1.17E-06	119.922	113.408
	SD	2.90E-07	5.517	15.700
	SEM	1.67E-07	3.185	9.065
TMN 133-1	dl	1.07E-06	117.516	168.345
		1.40E-06	153.548	213.791
		2.16E-06	138.52	196.266
		8.27E-07	171.103	177.807
		1.16E-06	155.986	197.146
		2.08E-06	149.537	152.836
		9.11E-07	162.463	145.743
	MW	1.37E-06	149.810	178.848
	SD	5.41E-07	17.493	24.977
	SEM	2.04E-07	6.612	9.441
	dm	1.51E-06	163.62	159.748
		1.51E-06	180.216	210.776
		9.23E-07	140.94	160.308
	MW	1.31E-06	161.592	176.944
	SD	3.38E-07	19.716	29.301
	SEM	1.95E-07	11.383	16.917
	vl	8.76E-07	166.833	213.963
		1.24E-06	174.656	218.424
		1.28E-06	153.962	209.845
		3.02E-06	156.666	233.679
	MW	1.60E-06	163.029	218.978
	SD	9.63E-07	9.528	10.408
	SEM	4.81E-07	4.764	5.204
	vm	2.29E-06	156.515	210.588
		1.96E-06	167.798	223.538
		2.05E-06	129.471	162.353
	MW	2.10E-06	151.261	198.826
	SD	1.71E-07	19.696	32.244
	SEM	9.86E-08	11.372	18.616

WT	Striatum-Region	Größe ChAT-Neurone	rote Fluoreszenz	grüne Fluoreszenz
BL6 37-1	dl		9.56E-07	109.285
			1.20E-06	90.111
			2.07E-06	104.557
			8.97E-07	107.55
			1.07E-06	108.052
			1.04E-06	108.782
		MW	1.21E-06	1.05E+02
		SD	4.38E-07	7.35E+00
		SEM	1.79E-07	3.00E+00
				8.94E+00
	dm		8.02E-07	93.201
			7.16E-07	95.234
			8.57E-07	95.556
			1.21E-06	90.835
		MW	8.96E-07	9.37E+01
		SD	2.16E-07	2.18E+00
		SEM	1.08E-07	1.09E+00
				5.86E+00
	vl		2.65E-06	85.211
			1.27E-06	73.1
		MW	1.96E-06	7.92E+01
		SD	9.72E-07	8.56E+00
		SEM	6.88E-07	6.06E+00
				9.38E+00
	vm		1.10E-06	88.471
			1.13E-06	87.159
			8.86E-07	81.687
		MW	1.04E-06	8.58E+01
		SD	1.33E-07	3.60E+00
		SEM	7.70E-08	2.08E+00
				1.08E+01
BL6 37-2	dl		1.28E-06	138.328
			1.07E-06	110.19
			1.83E-06	137.467
			1.59E-06	132.007
			6.17E-07	112.026
			1.36E-06	117.19
			9.10E-07	86.155
		MW	1.24E-06	1.19E+02
		SD	4.11E-07	1.87E+01
		SEM	1.55E-07	7.06E+00
	dm		1.09E-06	92.069
			8.35E-07	100.662
			5.31E-07	93.661
			7.11E-07	93.723
		MW	7.92E-07	9.50E+01
		SD	2.35E-07	3.83E+00
		SEM	1.18E-07	1.92E+00
				7.79E+00
	vl		9.60E-07	106.715
				136.857

		1.20E-06	95.972	103.656
	MW	1.08E-06	1.01E+02	1.20E+02
	SD	1.72E-07	7.60E+00	2.35E+01
	SEM	1.22E-07	5.37E+00	1.66E+01
vm		1.17E-06	109.779	108.36
BL6 37-3	dl	1.24E-06	96.978	147.981
		1.06E-06	93.773	148.991
		6.28E-07	94.974	100.342
		9.43E-07	78.423	112.967
		6.13E-07	104.423	99.11
		9.54E-07	95.866	111.514
		1.19E-06	95.354	121.423
	MW	9.47E-07	9.43E+01	1.20E+02
	SD	2.49E-07	7.81E+00	2.07E+01
	SEM	9.39E-08	2.95E+00	7.82E+00
	vl	1.92E-06	78.577	69.797
		1.21E-06	81.136	73.835
		1.45E-06	63.587	63.247
		MW	1.53E-06	7.44E+01
		SD	3.60E-07	9.48E+00
		SEM	2.08E-07	5.47E+00
				3.09E+00
	dm	9.71E-07	79.241	110.171
		9.76E-07	74.617	108.291
		1.08E-06	158.566	133.179
		MW	1.01E-06	1.04E+02
		SD	6.27E-08	4.72E+01
		SEM	3.62E-08	2.72E+01
				8.00E+00
	vm	2.15E-06	86.339	177.018
		1.48E-06	80.327	140.237
		MW	1.82E-06	8.33E+01
		SD	4.72E-07	4.25E+00
		SEM	3.34E-07	3.01E+00
				1.84E+01
BL6 36-2	dl	1.27E-06	43.712	40.003
		1.09E-06	37.944	31.157
		1.31E-06	22.294	16.975
		1.67E-06	27.041	20.444
		1.16E-06	19.251	14.729
		MW	1.30E-06	3.00E+01
		SD	2.26E-07	1.04E+01
	SEM	1.01E-07	4.66E+00	4.76E+00
	dm	7.88E-07	78.928	94.293
		8.98E-07	80.135	78.091
		MW	8.43E-07	7.95E+01
		SD	7.75E-08	8.53E-01
		SEM	5.48E-08	6.04E-01
				8.10E+00
	vl	2.16E-06	57.877	59.546
		1.56E-06	49.483	49.701

	MW	1.86E-06	5.37E+01	5.46E+01
	SD	4.31E-07	5.94E+00	6.96E+00
	SEM	3.05E-07	4.20E+00	4.92E+00
vm		7.28E-07	57.808	55.699
		8.73E-07	63.169	69.354
	MW	8.00E-07	6.05E+01	6.25E+01
	SD	1.03E-07	3.79E+00	9.66E+00
	SEM	7.26E-08	2.68E+00	6.83E+00
BL6 36-3 dl		1.01E-06	121.467	112.585
		1.21E-06	121.665	94.404
		1.21E-06	101.258	84.425
		1.21E-06	101.443	103.573
		9.32E-07	111.701	92.274
		9.06E-07	120.844	117.987
		1.76E-06	116.173	106.85
		1.18E-06	118.182	100.055
		7.42E-07	97.684	70.915
	MW	1.13E-06	1.12E+02	9.81E+01
	SD	2.89E-07	9.67E+00	1.45E+01
	SEM	9.62E-08	3.22E+00	4.84E+00
dm		1.38E-06	120.341	118.041
		1.71E-06	106.606	103.297
		1.03E-06	91.875	78.809
	MW	1.37E-06	1.06E+02	1.00E+02
	SD	3.42E-07	1.42E+01	1.98E+01
	SEM	1.97E-07	8.22E+00	1.14E+01
vl		1.56E-06	102.864	126.978
		1.15E-06	95.936	128.03
		1.43E-06	100.066	123.003
	MW	1.38E-06	9.96E+01	1.26E+02
	SD	2.12E-07	3.49E+00	2.65E+00
	SEM	1.22E-07	2.01E+00	1.53E+00
vm		1.49E-06	80.843	73.477
		1.31E-06	98.432	102.997
		1.59E-06	107.796	117.892
	MW	1.47E-06	9.57E+01	9.81E+01
	SD	1.40E-07	1.37E+01	2.26E+01
	SEM	8.08E-08	7.90E+00	1.31E+01
BL6 36-4 dl		2.06E-06	170.129	212.018
		1.30E-06	151.586	183.023
		1.12E-06	137.428	179.783
		8.69E-07	153.633	204.15
		1.20E-06	168.046	154.365
		9.49E-07	161.298	179.041
		8.17E-07	127.715	135.859
	MW	1.19E-06	1.53E+02	1.78E+02
	SD	4.23E-07	1.57E+01	2.65E+01

	SEM	1.60E-07	5.92E+00	1.00E+01
dm		2.33E-06	165.685	220.184
		1.39E-06	136.518	168.095
	MW	1.86E-06	1.51E+02	1.94E+02
	SD	6.64E-07	2.06E+01	3.68E+01
	SEM	4.70E-07	1.46E+01	2.60E+01
vl		1.34E-06	154.436	179.06
		1.21E-06	162.617	195.903
		9.60E-07	133.201	173.428
	MW	1.17E-06	1.50E+02	1.83E+02
	SD	1.91E-07	1.52E+01	1.17E+01
	SEM	1.10E-07	8.77E+00	6.75E+00
vm		1.19E-06	140.665	177.309
		8.85E-07	151.119	153.815
		5.57E-07	113.881	110.112
	MW	8.79E-07	1.35E+02	1.47E+02
	SD	3.17851E-07	19.2064981	34.10121468
	SEM	1.84E-07	1.11E+01	1.97E+01

9.6.3 Sub P-positive Zellen

Die folgende Tabelle zeigt die durchschnittlichen Pixelwerte der roten und grünen Fluoreszenz in Sub P-positiven Zellen. Diese wurden nach Gruppen mit den dazugehörigen Mittelwerten, Standardabweichungen und Standardfehlern sortiert.

DYT1 KI	Striatum-Region	Fluoreszenz	Pixelwerte	
TMN 133-1	dl	rot	164.687	MW rot 164.117
		grün	185.373	SD rot 8.930
	dm	rot	174.059	SEM rot 4.465
		grün	196.87	
	vl	rot	165.373	MW grün 191.104
		grün	196.408	SD grün 6.396
	vm	rot	152.348	SEM grün 3.198
		grün	185.765	
TMN 134-1	dl	rot	106.229	MW rot 151.304
		grün	93.34	SD rot 31.737
	dm	rot	152.255	SEM rot 15.869
		grün	144.507	
	vl	rot	176.166	MW grün 143.713
		grün	159.218	SD grün 36.237
	vm	rot	170.566	SEM grün 18.119
		grün	177.785	
TMN 134-2	dl	rot	183.05	MW rot 174.021
		grün	118.194	SD rot 8.266
	dm	rot	175.436	SEM rot 4.133
		grün	124.625	

	vl	rot	174.583	MW grün	111.799
		grün	103.208	SD grün	11.434
	vm	rot	163.015	SEM grün	5.717
		grün	101.17		
TMN 134-3	dl	rot	185.532	MW rot	200.880
		grün	124.277	SD rot	11.387
	dm	rot	201.528	SEM rot	5.693
		grün	146.736		
	vl	rot	212.97	MW grün	141.675
		grün	135.991	SD grün	15.114
	vm	rot	203.49	SEM grün	7.557
		grün	159.695		
TMN 134-4	dl	rot	86.359	MW rot	93.518
		grün	62.012	SD rot	5.974
	dm	rot	100.983	SEM rot	2.987
		grün	89.627		
	vl	rot	93.477	MW grün	76.973
		grün	66.271	SD grün	14.918
	vm	rot	93.252	SEM grün	7.459
		grün	89.98		
TMN 134-5	dl	rot	118.064	MW rot	118.694
		grün	84.925	SD rot	9.513
	dm	rot	130.039	SEM rot	4.756
		grün	103.845		
	vl	rot	119.855	MW grün	95.922
		grün	98.993	SD grün	8.024
	vm	rot	106.819	SEM grün	4.012
		grün	95.923		

WT	Striatum-Region	Fluoreszenz	Pixelwerte		
BL6 36-2	dl	rot	118.686	MW rot	138.342
		grün	97.566	SD rot	22.195
	dm	rot	122.912	SEM rot	11.098
		grün	136.32		
	vl	rot	166.792	MW grün	136.758
		grün	149.757	SD grün	28.369
	vm	rot	144.976	SEM grün	14.184
		grün	163.389		
BL6 36-3	dl	rot	176.735	MW rot	169.447
		grün	172.138	SD rot	15.584
	dm	rot	150.229	SEM rot	7.792
		grün	151.449		
	vl	rot	186.251	MW grün	165.454
		grün	175.105	SD grün	10.636
	vm	rot	164.572	SEM grün	5.318
		grün	163.122		

BL6 36-4	dl	rot	211.04	MW rot	218.406
		grün	181.489	SD rot	13.729
	dm	rot	234.971	SEM rot	6.865
		grün	236.351		
	vl	rot	203.945	MW grün	195.047
		grün	172.169	SD grün	28.501
	vm	rot	223.669	SEM grün	14.251
		grün	190.179		
BL6 37-1	dl	rot	104.716	MW rot	108.144
		grün	119.032	SD rot	4.873
	dm	rot	107.611	SEM rot	2.436
		grün	133.23		
	vl	rot	115.191	MW grün	131.652
		grün	132.391	SD grün	9.460
	vm	rot	105.057	SEM grün	4.730
		grün	141.955		
BL6 37-2	dl	rot	133.184	MW rot	135.513
		grün	145.546	SD rot	3.330
	dm	rot	137.895	SEM rot	1.665
		grün	167.144		
	vl	rot	132.158	MW grün	155.014
		grün	149.022	SD grün	9.726
	vm	rot	138.816	SEM grün	4.863
		grün	158.342		
BL6 37-3	dl	rot	185.373	MW rot	191.056
		grün	171.899	SD rot	5.113
	dm	rot	188.1	SEM rot	2.557
		grün	166.068		
	vl	rot	195.605	MW grün	172.104
		grün	188.106	SD grün	11.370
	vm	rot	195.144	SEM grün	5.685
		grün	162.342		

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe

.....
Datum

.....
Unterschrift

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Angelika Richter außerordentlich für das Überlassen des spannenden Promotionsthemas und der freundlichen und immerwährenden Unterstützung zum Verfassen dieser Dissertation.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Franziska Richter für die fachliche Einweisung in die Methoden und der optimistischen Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung der wissenschaftlichen Versuche und Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Achim Aigner danke ich herzlichst für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können sowie der Betreuung und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei:

meinen Mitstreitern Mieke, Anne, Julia, Stefanie und Christoph für die wunderbare Zusammenarbeit, den informativen Austausch und die Aufmunterungen in schweren Zeiten.

Frau Ina Hochheim und Steffi Fuchs für die stets gewährte Hilfsbereitschaft und nützlichen Tipps.

Allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit.

Ein großer und liebevoller Dank gilt meinen Eltern, die mich jederzeit motiviert und unterstützt haben und die Hoffnung nie aufgegeben haben, dass ich alles schaffen kann.

Meinem Freund danke ich vom Herzen für seine unermessliche Zuversicht und Geduld sowie den anregenden und aufbauenden Worten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Laura Klein

geboren am 16.02.1991 in Berlin

ledig

Praktische Erfahrungen

- | | |
|-----------------|---|
| seit 10/2017 | Elternzeit für Tochter Mia |
| seit 11/2015 | <i>Angestellte Apothekerin</i>
Central-Apotheke Leipzig
➤ Kundenbetreuung und Apothekenwirtschaft |
| 09/2015-07/2017 | <i>Doktorand/wissenschaftliche Hilfskraft bzw. Mitarbeiter</i>
Universität Leipzig
➤ (q)PCR, Immunhistologie
➤ Quantifizierung und Validierung mit LC-MS/MS
➤ stereotaktische OPs, Tierpflege |
| 12/2014-05/2015 | <i>Pharmazeut im Praktikum</i>
Galerie Apotheke Wolfsburg
➤ Kundenbetreuung
➤ Galenische Laborarbeiten |
| 06/2014-11/2014 | <i>Pharmazeut im Praktikum</i>
Bayer Pharma AG Berlin
➤ Zellkultur, Elektrophoresetechnik, Immunoassay
➤ In-vivo Experimente Maus und Ratte |
| 12/2013-03/2014 | <i>Wissenschaftlicher Mitarbeiter</i>
Freie Universität Berlin
➤ In-vivo Untersuchungen mittels Telemetrie
➤ Vorbereitung Galenikpraktikum |
| 03/2013-05/2013 | <i>Studentische Hilfskraft</i>
Universität Leipzig
➤ PCR und Immunhistologie |

-
- | | |
|-----------------|---|
| 10/2012-12/2012 | <i>Studentische Hilfskraft</i>
Universität Leipzig
➤ Kontraktionssimulation am Organbad |
|-----------------|---|

Ausbildung

- | | |
|-----------------|---|
| 11/2013-04/2014 | <i>Diplom Pharmazeutin</i>
Freie Universität Berlin
➤ In vivo Untersuchungen an Mäusen
➤ Telemetrische Körpertemperaturmessungen |
| 11/2013-05/2015 | <i>3.Staatsexamen Pharmazie</i>
Universität Leipzig
➤ Gesetzliche Grundlagen der Apothekenpraxis
➤ Kundenberatung und galenische Laborarbeiten |
| 10/2009-09/2013 | <i>1. und 2.Staatsexamen Pharmazie</i>
Universität Leipzig |
| 09/2001-05/2009 | <i>Allgemeine Hochschulreife</i>
Käthe-Kollwitz-Oberschule Berlin |

Weiterbildung

- | | |
|--------------|--|
| 02 & 05/2016 | <i>Versuchstierkunde mit Schwerpunkt Maus und Ratte</i>
Universität Leipzig
➤ Ethik, Rechtsgrundlagen der Tierhaltung
➤ Umgang mit Versuchstieren |
|--------------|--|

Besondere Kenntnisse

Fremdsprachen	Englisch (sehr gute Kenntnisse) Spanisch (Grundkenntnisse)
---------------	---

Computer	Microsoft Office, SigmaPlot
----------	-----------------------------

Hobbys

Basketballspielen
Klavierspielen

Leipzig,

Ort, Datum

Unterschrift